

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Bc. Martina Vinopalová

Dynamika encystace střevního prvoka *Giardia intestinalis*

Dynamics of *Giardia intestinalis* encystation

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 12. 8. 2018

Podpis

Poděkování:

Ráda bych v první řadě poděkovala svému školiteli Pavlovi Doležalovi za svůj čas a veškeré rady, které mi za můj pobyt v jeho laboratoři věnoval. Velký dík patří také jednotce Luďce za veškerou ochotu a pomoc, kterou mi nesčetněkrát poskytli. Jim a dalším členům naší laboratoře bych ráda poděkovala za příjemnou a přátelskou atmosféru, kterou vytvářejí. Ráda bych také poděkovala laborantkám Míše a Evě, bez kterých by naše laboratoř nemohla fungovat. Poděkování patří též členům IMCF v BIOCEVu za veškerou pomoc, kterou mi poskytli s mikroskopováním. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala své mamce a přátelům za veškerou jejich podporu a porozumění.

Abstrakt

Giardia intestinalis je anaerobní prvok, který parazituje v tenkém střevě lidí a dalších obratlových hostitelů. Tento kosmopolitní parazit, který způsobuje průjemová onemocnění, se přenáší kontaminovanou vodou či potravinami ve stádiu rezistentní cysty. Proces encystace zahrnuje řadu dějů, které vedou ke kompletní přestavbě buňky do podoby infekčního stádia. Cílem této práce bylo vizualizovat dané přestavby *in vivo* pomocí metody enzymatického značení proteinů. Pro účely této práce byly vybrány enzymatické tagy Y-FAST a HaloTag, které umožňují sledování živých buněk za anaerobních podmínek. Byly vytvořeny konstrukty chimerických proteinů pro sledování dynamiky encystačních váčků, struktur endoplasmatického retikula, adhezivního disku a mitózy. Pomocí vytvořených konstruktů se nám úspěšně podařilo sledovat dynamiku encystačních váčků a adhezivního disku *in vivo*. Zároveň tato práce poskytla zcela nové molekulární nástroje pro vytvoření uceleného obrázku dynamiky buněčné přestavby parazita během encystace.

Klíčová slova: encystace, encystační váčky, adhezivní disk, jádra, *Giardia intestinalis*, enzymatické značení

Abstract

Giardia intestinalis is an anaerobic parasite, that colonizes the small intestine of humans and other vertebrate hosts. This cosmopolitan parasite, which causes diarrhoea, is transmitted by contaminated water or food via a resistant stage, the cyst. The encystation process involves a number of events that lead to a complete reconstruction of the cell into the form of infectious cyst. The aim of this work was to visualize these modifications *in vivo* by means of enzymatic labelling of proteins. For the purposes of this work, enzymatic tags Y-FAST and HaloTag were chosen, as they enable visualizing live cells under anaerobic conditions. Chimeric protein constructs were created to visualize the dynamics of the encystation vesicles, the structures of endoplasmic reticulum, the adhesive disc and mitosis. Using the developed constructs, we successfully followed the dynamics of the encystation vesicles and the adhesive disc *in vivo*. Finally, this work has provided novel molecular tools, which will be used to follow the overall redesign of the parasite cell during encystation.

Key words: encystation, encystation vesicles, adhesive disc, nuclei, *Giardia intestinalis*, enzymatic tagging

Obsah

1	Úvod	1
2	Literární přehled.....	2
2.1	Encystace.....	2
2.1.1	Encystační váčky.....	3
2.1.2	Buněčná signalizace a regulace exprese proteinů během encystace	5
2.1.3	Sekretorická dráha proteinových komponent stěny cysty	7
2.1.3.1	Biogeneze ESV	8
2.1.3.2	Maturace ESV.....	11
2.1.3.3	Sekrece CWM.....	14
2.1.4	ECV váčky	14
2.1.5	Struktura a složení stěny cysty	15
2.1.6	Morfologické změny během encystace	16
2.2	Enzymatické tagy pro live-imaging.....	17
2.2.1	HaloTag.....	18
2.2.2	Y-FAST.....	19
3	Cíle práce.....	20
4	Materiál a metodika	21
4.1	Organismy a použitá média.....	21
4.1.1	<i>Escherichia coli</i>	21
4.1.2	<i>Giardia intestinalis</i>	21
4.2	Plazmidy	22
4.3	Amplifikace genů a izolace	23
4.4	Klonování DNA fragmentů	25
4.5	Transfekce trofozoitů <i>G. intestinalis</i>	26
4.6	Encystace <i>G. intestinalis</i>	26
4.6.1	Uppsala encystační protokol	26

4.6.2	Dvou-krokový encystační protokol	27
4.7	SDS-PAGE elektroforéza a western blot.....	28
4.7.1	Sklízení <i>G. intestinalis</i>	28
4.7.2	SDS-PAGE elektroforéza	28
4.7.3	Western blot	28
4.8	Příprava preparátů a fluorescenční mikroskopie	29
4.8.1	Metanol-acetonová fixace	29
4.8.2	Paraformaldehydová fixace	30
4.8.3	Live-imaging	31
4.8.3.1	Příprava buněk	31
4.8.3.2	HaloTag značení	31
4.8.3.3	Y-FAST značení	32
4.8.4	Fluorescenční mikroskopie.....	32
4.8.4.1	Nikon Ti-E	32
4.8.4.2	Leica TSC SP8.....	32
5	Výsledky	33
5.1	Encystace <i>G. intestinalis</i> in vitro.....	33
5.2	Expres konstrukťů proteinů fúzovaných s enzymatickými tagy v <i>G. intestinalis</i> ..	33
5.2.1	CWP1-Y-FAST-pTG.....	33
5.2.2	CWP1-HaloTag-pTG.....	35
5.2.3	CenH3-HA-Y-FAST-pTG	36
5.2.4	Ndc80-HA-Y-FAST-pTG	36
5.2.5	B-giardin-HA-Y-FAST-pTG	39
5.2.6	SEC24-like-V5-HaloTag-pUC57-mini.....	41
5.3	Vliv exprese chimerických proteinů na průběh encystace.....	42
5.3.1	CWP1-HaloTag.....	42
5.3.2	CWP1-Y-FAST.....	43
5.4	Live imaging prostřednictvím enzymatického značení	44

5.4.1	CWP1-HaloTag.....	44
5.4.2	CWP1-Y-FAST.....	45
5.4.3	B-giardin-HA-Y-FAST.....	47
5.4.4	SEC24-like-V5-HaloTag a CWP1-Y-FAST	48
5.5	<i>In vivo</i> pozorování encystace netransformovaných buněk <i>G. intestinalis</i>	50
6	Diskuze	53
6.1	Exprese chimerických proteinů v <i>G. intestinalis</i>	53
6.2	Funkčnost enzymatického značení v <i>G. intestinalis</i>	54
6.3	Live imaging encystujících trofozoitů <i>G. intestinalis</i>	55
6.3.1	Dynamika ESV váčků	55
6.3.2	Dynamika adhezivního disku	57
6.3.3	Dynamika encystace v netransformovaných buňkách <i>G. intestinalis</i>	58
7	Závěr.....	59
8	Seznam často používaných zkratk.....	60
9	Seznam použité literatury	62
10	Seznam příloh.....	69

1 Úvod

Giardia intestinalis, patřící do skupiny Diplomonadida, je světově rozšířeným jednobuněčným parazitem zažívacího traktu člověka a dalších obratlovců. Hostitel se nakazí pozřením rezistentního stádia, cysty, z kontaminované vody či potravin nebo fekálně-orální cestou. Uvnitř žaludku dochází k indukci excystace, která vyústí v uvolnění parazita v tenkém střevě. Excystování jedinci, trofozoiti, jsou dvoujadernou, vegetativní formou se čtyřmi páry bičíků a adhezivním diskem. Trofozoiti kolonizují epitel tenkého střeva, kam se přichytávají pomocí adhezivního disku. Svým působením na střevní epitel způsobují malabsorpci živin a průjemová onemocnění. Potravu přijímají celým povrchem těla prostřednictvím pinocytózy. Rozmnožují se zde asexuálně binárním dělením. Při průchodu zažívacím systémem se tento mikroaerofilní prvok střetává s podmínkami, které u něj vyvolávají proces encystace. Tímto procesem vzniká oválná, čtyřjaderná cysta bez viditelných bičíků či adhezivního disku. Cysty jsou vylučovány s výkaly a jsou schopny čelit vnějším podmínkám.

Studium procesu encystace, během které dochází ke kompletní přestavbě buňky, je důležité z medicínského hlediska, jelikož vede ke vzniku infekčních forem, které jsou schopné vydržet chlorování vody používané pro její čištění. *G. intestinalis* je navíc díky snadné kultivaci a značné škále dostupných experimentálních metod excelentním modelem pro studium encystace parazitických prvků. Kromě existence metod genetické manipulace je velmi příhodný fakt, že podmínky, které vyvolávají encystaci u tohoto prvoka, lze simulovat *in vitro*.

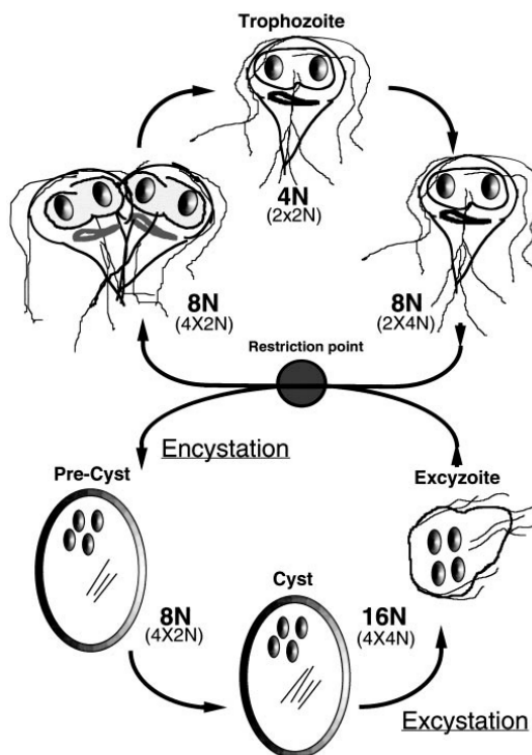
Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o molekulárně buněčných změnách, které vedou k transformaci vegetativní formy *G. intestinalis* na rezistentní cystu. Cílem této práce je vytvoření systému, který by umožnil dlouhodobé pozorování jednotlivých buněk *in vivo*. Asynchronní povaha encystace v rámci populace ztěžuje určení posloupnosti jednotlivých procesů a časové definování fází encystace. Sledování dynamiky různých buněčných struktur v rámci jedné buňky během encystace pomocí enzymatických tagů by mohlo vést k objasnění klíčových aspektů této pozoruhodné buněčné transformace.

2 Literární přehled

2.1 Encystace

Trofozoiti *G. intestinalis* kolonizují přední části tenkého střeva, především se nacházejí v duodenu. Za hlavní místo encystace *G. intestinalis* v myším modelu byly považovány střední a zadní části jejunu (Gillin et al., 1987). Pozdější studie z myších modelů ukázaly, že trofozoiti *G. intestinalis* se shromažďují do oddělených ohnisek v předních i zadních částech tenkého střeva. Zde také zahajují encystaci. Zvýšená lokální populační hustota by mohla vést k místnímu snížení dostupnosti živin a hromadění odpadních produktů, což by mohlo vyvolávat encystaci (Barash et al., 2017). Fyziologické podmínky středních částí tenkého střeva lze simulovat *in vitro* zvýšením koncentrace žlučových solí a mastných kyselin v kultivačním médiu a upravením pH na hodnotu 7,8. Tyto podmínky stačí k vyvolání encystace *in vitro* kultivovaných trofozoitů a je možné pozorovat tvorbu oválných čtyřjaderných cyst, které jsou odolné vůči hypotonickým podmínkám (Gillin et al., 1987; Gillin et al., 1988).

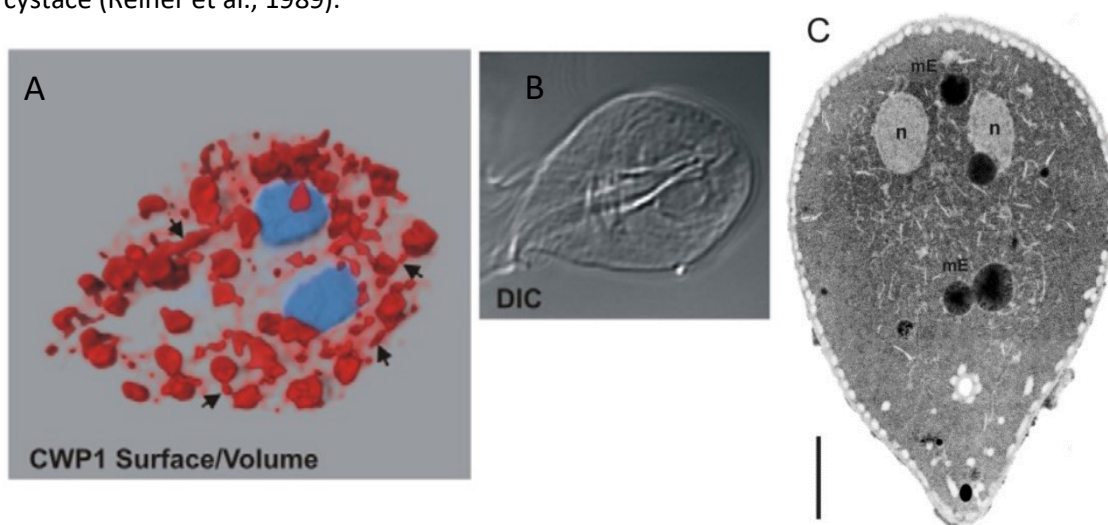
Trofozoiti *G. intestinalis* se většinu svého životního cyklu nachází v G_2 fázi, kdy jsou obě jejich jádra tetraploidní. Je to také fáze jejich životního cyklu, ze které iniciují encystaci. Jelikož během encystace dochází ke zdvojení jader a replikaci DNA, je konečným výsledkem encystace čtyřjaderná cysta s ploidií 16N. Po perorální infekci hostitele, kdy dochází k excystaci, se tak nově excystované buňky, excyzoiti, mohou rychle dvakrát za sebou rozdělit bez potřeby replikace DNA a vytvořit tak čtyři dvoujaderné trofozoity s ploidií 4N (Obr. 1). Tento mechanismus tak usnadňuje rychlou kolonizaci střeva s nižší potřebnou infekční dávkou cyst (Bernander et al., 2001).



Obrázek 1: Model životního cyklu *G. intestinalis*. Trofozoiti v G_1 fázi s ploidií 4N podstupují replikaci DNA a tvoří 8N trofozoity v G_2 fázi. V tomto bodě může dojít k rozdělení jader a cytokinezi, a tak k tvorbě dvou 4N trofozoitů či k iniciaci encystace. Proces encystace vede k tvorbě čtyřjaderných cyst s ploidií 16N. Po obdržení stimulů k excystaci se objevuje čtyřjaderný excyzoit s ploidií 16N. Ten se dvakrát rozdělí za tvorby čtyř dvoujaderných trofozoitů s ploidií 4N. Tučně je vyznačena ploidie příslušných stádií. V závorkách je uveden počet jader s jejich ploidií v daném stádiu (Bernander et al., 2001).

2.1.1 Encystační váčky

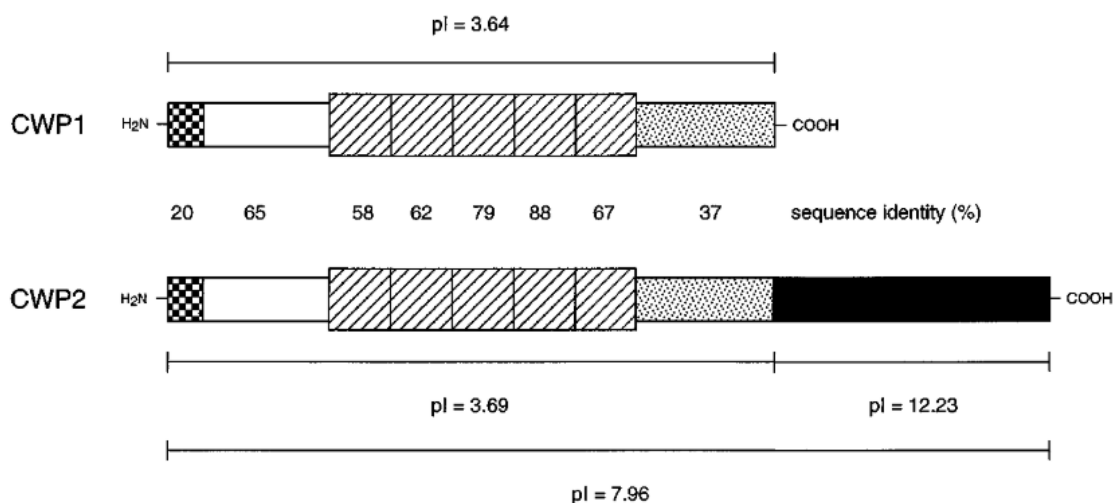
Povrch zralých cyst je kryt glykosylovanými proteiny, které jsou z buňky exportovány v tzv. encystačních váčkách (encystation-specific vesicles — ESVs). Tyto váčky se začínají objevovat již v raných fázích encystace po přibližně čtyřech hodinách od indukce encystace před zakulacením trofozoitů a jejich odlepením z povrchu, na kterém adherují. Měří v průměru 1,6—2,6 μm a jsou lokalizovány v cytoplasmě (Obr. 2) (Reiner et al., 1989). V pozdějších studiích ovšem byly identifikovány i ESV váčky o velikosti 0,3—1,1 μm (Midlej et al., 2013). V místech mohou být pozorována propojení s cytoplasmatickou membránou. V raných fázích encystace se začínají exprimovat proteiny o velikosti 21-39 kDa a jejich exprese postupně sílí po dobu 24 hodin od indukce encystace. Další skupina proteinů o velikosti 66-103 kDa se začíná objevovat až po 19 hodinách. Cysty se stávají odolnými k hypotonickým podmínkám až po 40-48 hodinách od indukce encystace (Reiner et al., 1989).



Obrázek 2: Zobrazení ESV váček. A) 3D rekonstrukce ESV váček v encystujících trofozoitech. Červeně jsou značené CWP1 proteiny v ESV váčkách, modře je značena DNA, která je obsažena v jádrech. Šípky ukazují na tubulární propojení ESV váček. B) Obrázek, který byl pořízen pomocí diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC), ukazuje morfologické uspořádání odpovídající buňky (Stefanic et al., 2009). C) Snímek encystujícího trofozoita, který byl pořízen pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) po 14 hodinách od indukce encystace. Jádra jsou označena písmenem „n“. Zralé ESV váčky jsou označeny „mE“. Měřítko: 2 μm (Marti et al., 2003a).

Proteiny transportované v lumen ESV váček na povrch encystujících trofozoitů se nazývají CWP1, 2 a 3. Tyto proteiny mezi sebou vykazují strukturní a sekvenční podobnost. Po predikované N-terminální signální sekvenci, která proteiny směřuje do sekretorické dráhy, se nacházejí 23-24 aminokyselin dlouhé leucin-bohaté repetice (LRR) se sedmi hydrofobními zbytky (Obr. 3) (Luján et al., 1995b; Mowatt et al., 1995; Sun et al., 2003). CWP1 a CWP2 obsahují pět takovýchto repetitiv (Luján et al., 1995b), pátá LRR CWP3 je však nekompletní s chybějícími třemi hydrofobními zbytky (Sun et al., 2003). LRR domény pravděpodobně hrají roli v intermolekulárních interakcích CWP proteinů, které jsou jinak bohaté také na cysteinové zbytky umožňující tvorbu disulfidických můstků, a tedy tvorbu proteinových komplexů (Luján et al., 1995b; Mowatt et al., 1995; Sun et al., 2003). Tvorba intermolekulárních interakcí mezi těmito proteiny se zdá být důležitá pro tvorbu a stabilitu ESV (Luján et al., 1995b; Sun et al., 2003). Hojně se zde také vyskytují aminokyseliny serin a threonin, které mohou sloužit jako místa pro potencionální O-glykosylaci

těchto proteinů (Luján et al., 1995b). mRNA CWP proteinů je v určité míře transkribována i v ne-encystujících trofozoitech, ovšem během několika hodin od indukce encystace se její množství zvýší až 140krát. K translaci CWP proteinů ovšem dochází až při encystaci (Luján et al., 1995b; Mowatt et al., 1995; Sun et al., 2003). V raných fázích jejich exprese tvoří tyto proteiny za neredukujících podmínek komplexy velikostně odpovídající dimerům či oligomerům, avšak později tvoří větší struktury. Autoři se domnívají, že by před transportem CWP proteinů na povrch buňky mohlo být v ESV neznámými mechanismy bráněno tvorbě větších komplexů (Luján et al., 1995b; Mowatt et al., 1995; Sun et al., 2003).



Obrázek 3: Schéma domén proteinů CWP1 a CWP2. Na N-konci se nachází signální sekvence (kostkovaná oblast), následovaná konzervovanou N-terminální doménou (bílá oblast). Pruhaně je vyznačena doména s pěticí LRR repetice. Tečkovaně jsou vyznačeny oblasti bohaté na cystein. CWP2 má navíc 121 aminokyselin dlouhou, bazickou C-terminální oblast (černá oblast). Čísla uprostřed vyjadřují procentuální shodu v sekvenci aminokyselin odpovídajících domén jednotlivých proteinů. Vyznačeny jsou také isoelektrické body obou proteinů a jejich částí (Luján et al., 1995b).

Protein CWP1 ve své redukované podobě disponuje molekulovou vahou 26 kDa (Mowatt et al., 1995). Ačkoliv je N-terminální hydrofobní doména CWP1 proteinu dostačující pro vstup CWP1 proteinu do sekretorické dráhy, k jeho lokalizaci do stěny cysty je nutná doména obsahující LRR. C-terminální doména tohoto proteinu neovlivňuje jeho lokalizaci, má ovšem stabilizující vliv na kovalentní proteinové interakce s dalšími proteiny (Hehl et al., 2000). Část CWP1 obsahující LRR repetice představuje lektinovou doménu vážící N-acetylgalaktosylamin (GalNAc) homopolymer stěny cysty (Chatterjee et al., 2010).

Protein CWP2 se v ESV váčcích vyskytuje ve formě 39kDa velkého prekurzoru, který je procesován odštěpením 13kDa úseku před či během jeho inkorporace do stěny cysty (Luján et al., 1995b). Molekulová hmotnost CWP3 je přibližně 28 kDa (Sun et al., 2003). Na rozdíl od CWP1, CWP2 a CWP3 přímo neváže GalNAc homopolymer a je tedy pravděpodobné, že jsou s materiálem stěny spojeny přes CWP1 (Chatterjee et al., 2010). Interakce těchto proteinů jsou zprostředkovány disulfidickými můstky. Tyto disulfidické můstky jsou upravovány protein disulfid isomerázami (PDI), které se vyskytují jak v ER, tak i v ESV váčcích a na povrchu encystujících buněk (Reiner et al., 2001).

Kromě CWP proteinů se v ESV váčcích vyskytují i jiné proteiny. Jedním z těchto proteinů je 170kDa protein HCNCp (Davids et al., 2006). Tento protein se do jisté míry podobá VSP proteinům. Je bohatý na cysteinové zbytky, je kyselý a obsahuje transmembránovou doménu s krátkým cytoplasmatickým C-koncem. Na rozdíl od VSP proteinů ovšem nemá „Zn finger“ motiv a má odlišnou C-terminální transmembránovou doménu. Na jeho N-konci je predikovaná signální sekvence. V buňkách se vyskytují také jeho kratší, procesované formy. Na rozdíl od CWP proteinů, je tento protein slabě exprimován i v neencystujících trofozoitech. Je v nich lokalizován v jaderném obalu, který představuje první cisternu ER. Během encystace jeho exprese sílí a nachází se v ESV váčcích. V cystách se nachází jak v jejich stěnách, tak i ve váčkovitých strukturách uvnitř cysty. Tyto váčkovité struktury by mohly představovat pozůstatky ESV váčků po sekreci jejich obsahu. Funkce tohoto proteinu nebyla zjištěna. Autoři ovšem hypotetizují, že vzhledem k jeho lokalizaci uvnitř cysty, by se tento protein mohl podílet na excystaci (Davids et al., 2006).

V encystačních váčcích se také vyskytují proteiny EGFCP1-6 (Chiu et al., 2010). Jsou to negativně nabitě proteiny o predikované velikosti přibližně 62 kDa s N-terminální signální sekvencí, která je směřuje do ESV váčků. Více než 10 % jejich peptidové sekvence se sestává z cysteinů, které jsou u nich pozičně konzervované. Mají alespoň osm EGF repetice, které jsou predikovány i u HCNCp. Autoři hypotetizují, že proteiny s EGF repeticemi by u *G. intestinalis* mohly sloužit k regulaci adheze či by mohly hrát roli v buněčné signalizaci během excystace. EGFCP proteiny mají také dvě potencionální trypsin inhibující TIL domény. Je ovšem možné, že tyto domény nejsou kompletní, jelikož autoři nebyli schopni detekovat žádnou inhibující aktivitu EGFCP1 vůči trypsinu či chymotrypsinu. Tyto proteiny se v neencystujících trofozoitech nachází v ER a během encystace, kdy dochází k zvýšení jejich exprese, jsou pak nalezeny v ESV váčcích. V cystě se nachází v její stěně a částečně se nachází i uvnitř cysty. EGFCP proteiny mají pozitivní vliv na tvorbu stěny cysty a bylo také dokázáno, že exprese EGFCP1 má vliv i na expresi CWP1. Jejich přesnější funkce během encystace ovšem není známá (Chiu et al., 2010).

2.1.2 Buněčná signalizace a regulace exprese proteinů během encystace

Studium podmínek, které vyvolávají encystaci, vedlo ke zjištění, že za indukci tohoto děje stojí nedostatek cholesterolu v trofozoitech *G. intestinalis*. Zvýšená koncentrace žlučových solí v encystačním médiu zabraňuje vstupu cholesterolu do buňky. Nedostatek cholesterolu byl spojen s transkripční genů CWP proteinů a vznikem ESV váčků (Lujan et al., 1996)..

Do promotorových oblastí genů CWP proteinů a dalších proteinů asociovaných s encystací se váže i řada dalších faktorů, které aktivují jejich transkripci a jejichž exprese se při encystaci zvyšuje. Mezi ně patří MYB2 (Sun et al., 2002; Huang et al., 2008), GLP1-2 (Sun et al., 2006), ARID1 (Wang et al., 2007), WRKY (Pan et al., 2009), PAX1-2 (Wang et al., 2010; Chuang et al., 2012), E2F1 (Su et al., 2011). Bylo také ukázáno, že některé z nich mohou navzájem interagovat, jmenovitě E2F1 a MYB2 (Su et al., 2011).

Svou roli v encystaci mají také enzymy, které post-translačně modifikují proteiny. Kinázy ERK1 a ERK2, které v neencystujících trofozoitech především asociují s cytoskeletálními struktu-

rami, během encystace mění svou lokalizaci. Pravděpodobně však v tomto procesu zastávají odlišné funkce. Aktivita ERK1 je nejvyšší dvě hodiny od indukce encystace a následně její aktivita postupně klesá a předpokládá se, že její aktivita vede k zahájení encystace (Ellis et al., 2003). Aktivita ERK2 naopak dvě hodiny od indukce encystace klesá a zůstává na stálé hladině až do doby deset hodin od indukce encystace. Její aktivita je nejnižší 24 hodin od indukce encystace. Předpokládá se tedy, že její inaktivace je nutná pro tvorbu cyst. Autoři také navrhuji, že by tyto enzymy mohly být součástí MAP kinázové dráhy a že by jejich aktivace mohla souviset s dostupností cholesterolu v buňce (Ellis et al., 2003). Aktivita ERK1 vede ke zvýšení exprese transkripčních faktorů WRKY (Pan et al., 2009), PAX1 a PAX2. Navíc ERK1 proteiny PAX1 a PAX2 přímo fosforyluje, což naznačuje přímou roli MAP kinázové signální dráhy v transkripční aktivaci encystace (Chuang et al., 2012).

Součástí signálních drah vedoucích k transkripci CWP proteinů je i fosfatázová aktivita PP2A. Její bližší role ovšem dosud není známa. Podobně jako ERK1 a další proteiny, které by mohly hrát roli v signalizaci během encystace, se tento protein nachází v blízkosti bazálních tělísek. Autoři navrhuji, že by toto místo mohlo být centrem buněčné signalizace v *G. intestinalis* (Lauwaet et al., 2007).

Encystující buňky také mají větší obsah palmitoylovaných proteinů. Mezi ně patří i protein HCNC, který je obsažen v ESV váčcích (Merino et al., 2014). Tuto posttranslační úpravu proteinů uskutečňuje v *G. intestinalis* rodina devíti DHHC proteinů. Její členové se mezi sebou liší svou lokalizací, expresí a efektem na encystující buňky. Mimo jiné byla pozorována i změna exprese CWP proteinů vlivem těchto posttranslačních modifikátorů. Autoři této práce navrhuji možnou roli těchto proteinů v transportu transkripčních faktorů z cytoplasmy do jader. Dále však jejich funkce nebyla zjišťována (Merino et al., 2014).

Posttranslační modifikace proteinů slouží i v dráze vedoucí k umlčování exprese CWP proteinů v pozdějších fázích encystace. Enzym arginin deimináza (ADI), která katalyzuje v proteinech přeměnu argininu na citrulin, v pozdějších fázích encystace translokuje do jader. Zde svou aktivitou umlčuje expresi CWP proteinů. Není ovšem známo, které proteiny jsou zde jeho substrátem (Touz et al., 2008). Autoři navrhuji, že by cílem této modifikace mohly být histony. Za lokalizací ADI v jádrech během encystace stojí sumoylace proteinem SUMO. Neví se ovšem, zda sumoylace ADI způsobuje konformační změnu vedoucí k odhalení jaderného lokalizačního signálu ADI, či jestli tato posttranslační modifikace vede k zadržení ADI v jádrech (Vranych et al., 2014).

Jelikož encystace iniciuje v brzkých fázích G₂ fáze buněčného cyklu (Reiner et al., 2008), musí v tomto organismu existovat způsob, jak propojit regulaci buněčného cyklu s regulací zahájení encystace. Spojení obou procesů má na svědomí komplex proteinů CDK2-Cyklin A. Cyklin A, jehož exprese je během encystace zvýšená, interaguje s kinázou CDK2 a tím stimuluje její aktivitu. Aktivovaná kináza CDK2 fosforyluje transkripční faktor MYB2, což vede k zvýšení exprese CWP proteinů (Cho et al., 2012). V savčích buňkách bylo dokázáno, že komplex proteinů CDK2-Cyklin A spouští replikaci DNA v S fázi (Coverley et al., 2002). Tento komplex by tak mohl u *G. intestinalis* koordinovat oba buněčné procesy (Reiner et al., 2008).

Expres CWP proteinů a transkripčních faktorů aktivujících geny spojené s encystací je také regulována stabilitou jejich mRNA. Protein UPF1 snižuje stabilitu mRNA CWP proteinů a transkripčního faktoru MYB2, což vede k potlačování jejich exprese ve vegetativní fázi životního cyklu *G. intestinalis* (Chen et al., 2008b). Během encystace ovšem dochází k značnému snížení exprese UPF1 (Chen et al., 2008a), což umožňuje zahájení exprese uvedených proteinů (Chen et al., 2008b).

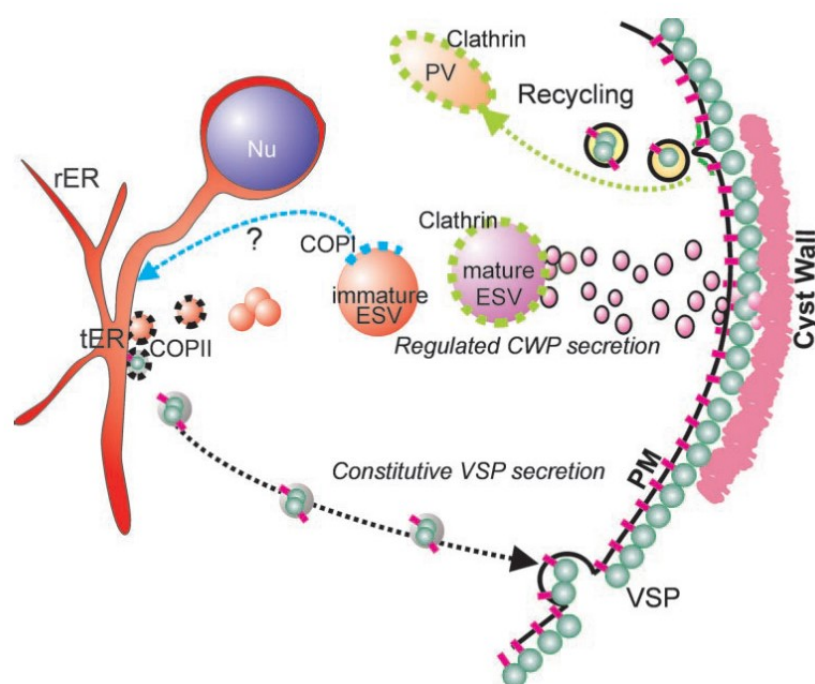
2.1.3 Sekreторická dráha proteinových komponent stěny cysty

I přestože v *G. intestinalis* chybí struktura morfologicky odpovídající Golgiho aparátu, se někteří autoři domnívají, že redukováná podoba této struktury v tomto organismu existuje alespoň v části jeho životního cyklu (Luján et al., 1995a). K tomuto závěru je přivádí fakt, že brefeldin A, známý inhibitor transportu napříč Golgiho komplexem (Misumi et al., 1986), inhibuje tvorbu sekrečních váček obsahujících CWP proteiny, které jsou nasyntetizované během encystace. V průběhu encystace dochází také k barvení perinukleárních struktur C₆-NDB-ceramidem (Luján et al., 1995a), markerem *trans*-Golgiho komplexu (Pagano et al., 1989). Tyto struktury byly také citlivé k působení brefeldinu A. V jejich blízkosti jsou lokalizovány váčky obsahující podjednotku „coatomeru“ β -COP a také ARF, který hraje roli v pučení váček z membrán Golgiho aparátu. Autoři došli k závěru, že oba tyto typy struktur odpovídají Golgiho komplexu v různých fázích maturatione. K tvorbě tohoto komplexu by mělo docházet pouze během encystace. Tuto hypotézu také podporuje fakt, že pouze během encystace byla detekována aktivita enzymů galaktosyltransferázy (GalT) a N-acetylgalaktosylamin transferázy (GalNAcT), které se u ostatních eukaryot účastní posttranslačních modifikací proteinů v Golgiho aparátu. Nutnost tvorby Golgiho komplexu právě v této části vývojového cyklu *G. intestinalis* autoři připisují potřebě syntézy stěny cysty, která je bohatá na sacharidy (Luján et al., 1995a).

Jiní autoři ovšem detekovali perinukleární struktury barvitelné C₆-NDB-ceramidem i v neencystujících trofozoitech (Lanfredi-Rangel et al., 1999) a nízké hladiny GalNAcT aktivity byly také detekovány již v populaci neencystujících trofozoitů, ačkoliv během encystace dochází k podstatnému zvýšení aktivity tohoto enzymu (Das and Gillin, 1996). Podle této teorie tedy existuje Golgiho komplex v *G. intestinalis* ve formě cisteren v blízkosti periferie jádra během celého životního cyklu tohoto parazita a v době encystace je pouze více stabilizován (Lanfredi-Rangel et al., 1999). Později však došlo k pozorování, že tyto cisterny jsou součástí spirálovitých struktur propojených s jaderným obalem. Tyto struktury byly nalezeny ve většině encystujících buněk. Občas však byly nalezeny také v neencystujících trofozoitech. Autoři považují tyto spirálovité struktury za součást endoplazmatického retikula (ER) (Marti et al., 2003b).

Další teorie připisuje status Golgiho aparátu encystačním váčkům ESV. Část populace ESV váček je také barvena fluorescenčně značeným ceramidem a mohla by tak představovat *trans*-Golgi u tohoto organismu (Hehl et al., 2000). Dle této teorie odpovídají ESV Golgiho komplexu-podobným cisternám, kdy *cis*, střední a *trans* cisterny Golgiho aparátu nejsou rozděleny v prostoru, ale v čase. Toto tvrzení je podpořeno tím, že sekreční dráha zahrnující ESV váčky využívá

komponenty anterográdního a retrográdního transportu buněk opisthokontních organismů (živočiškové a houby) (Marti et al., 2003a). GiSAR1, giardiový ortolog SAR1 GTPázy specifické pro tvorbu COPII váčků, se mimo jiné nachází ve strukturách známých jako „endoplasmic reticulum exit sites“ (ERES), kde kolokalizuje s CWP1 (Marti et al., 2003b). Vlastní lokalizace GiSAR1 přímo ve váčcích vznikajících z ER ukazuje na přítomnost COPII dependentní anterográdní dráhy v *G. intestinalis*. S ESV také kolokalizuje Giβ' COP, plášťová podjednotka COPI komplexu (Luján et al., 1995a; Marti et al., 2003b), který umožňuje retrográdní transport z ESV/Golgiho aparátu do ER. V pozdějších fázích encystace asociují ESV váčky s klatrinem, který by mohl napomáhat tvorbě váčků sekretujících CWP proteiny na povrch encystujících trofozoitů (Obr. 4). Třídění proteinů do různých sekretorických drah se však pravděpodobně uskutečňuje již na úrovni ER ve strukturách ERES (Marti et al., 2003a).



Obrázek 4: Model regulované sekrece CWP proteinů znázorňující tvorbu COPII váčků z ER a jejich následnou fúzi, díky níž vznikají vlastní ESV. ESV dozrávají pomocí COPI-dependentního retrográdního transportu a procesováním a modifikací svého obsahu. Klatrin asociuje se zralými ESV a umožňuje sekreci CWP proteinů a následnou tvorbu stěny cysty (Marti et al., 2003a).

2.1.3.1 Biogeneze ESV

ESV váčkům dávají vznik specifické rozšířené cisterny ER, které se na snímcích trofozoitů z transmisního elektronového mikroskopu jeví jako elektrontransparentní prohlubně. Během počátečních fází encystace dochází k značnému navýšení počtu těchto prohlubně. Po 6-12 hodinách encystace se tyto prohlubně zcela naplní amorfním elektrondenzním materiálem, který odpovídá CWP proteinům. Tyto cisterny mívají tvar mnohoúhelníků a autoři je považují za vznikající ESV. Rané ESV váčky se nacházejí v těsné blízkosti cisteren ER a místy mohou být pozorována i jejich propojení s ER. Jakmile jsou váčky zformovány, přestávají s ER asociovat. Typické kulaté

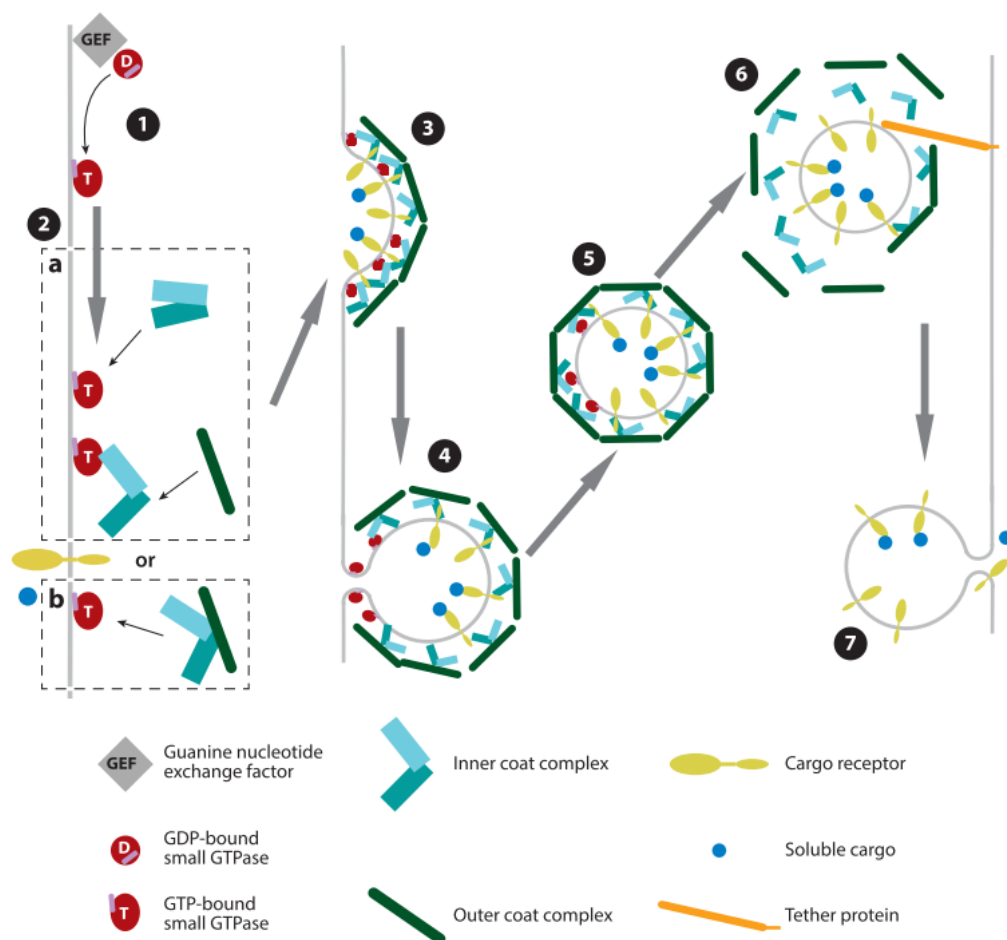
ESV váčky se začínají objevovat po 6 hodinách encystace a jejich spojení s ER mizí po 12 hodinách (Lanfredi-Rangel et al., 2003).

V počátečních fázích encystace je materiál stěny cysty hojně zastoupen v cisternách obklopujících jádro (McCaffery et al., 1994). Tyto perinukleární cisterny se tři hodiny po indukci encystace zvětšují a po šesti hodinách začínají tvořit prohlubně, které mají dát vznik ESV váčkům. Prohlubně se nacházejí jak v okolí jaderných membrán, tak i na specifických místech ER. Tyto struktury odpovídají strukturám značeným analogy ceramidu (viz výše). Po šesti hodinách od indukce encystace se CWP proteiny hromadí i v dalších částech ER a objevují se nezralé ESV váčky. I tyto místa jsou barvitelná C₆-NDB-ceramidem, stejně jako ESV váčky v různých stádiích zrání (Zamponi et al., 2017). Navíc glykosylace ceramidu glukosylceramid transferázou během encystace byla spojena s tvorbou ESV váčků (Mendez et al., 2013; Robles-Martinez et al., 2017).

Za tvorbou ESV stojí agregace a vazba CWP proteinů na neznámý receptor v lumen cisteren ER. Tento potencionální receptor by se měl vázat na C-terminální bazický konec CWP2. Tento protein by tak mohl být nukleárním bodem pro agregaci dalších CWP proteinů, která je nutná pro vypuštění váčků z ER (Gottig et al., 2006). Autoři předpokládají, že receptory pro tyto komplexy se nalézají v perinukleárních membránách ER. Navrhované receptory by nemusely být proteinové povahy, ale mohlo by se jednat o lipidové molekuly. Autoři argumentují tím, že syntéza proteinových receptorů pro takové množství CWP proteinových komplexů, které jsou potřebné pro tvorbu stěny cysty, není pravděpodobná (Gottig et al., 2006). Tuto hypotézu podporuje i fakt, že pro vznik ESV váčků se zdá být důležitá přítomnost lipidových raftů bohatých na cholesterol a GM1 glykolipidy (De Chatterjee et al., 2015). Pro tvorbu ESV váčků během encystace se zdá být nutná přítomnost všech CWP komponent, jelikož v buňkách s úplnou delecí alel genu CWP1 k jejich tvorbě nedochází. Tyto buňky však vytváří pseudocysty, které vykazují známky prodělání všech ostatních morfologických změn, ke kterým během encystace běžně dochází. To znamená, že tvorba ESV váčků a následná sekrece CWP na povrch cyst nejsou spřaženy s dalšími encystačními procesy (Ebner et al., 2016).

V eukaryotických organismech je anterográdní transport z ERES zprostředkováván COPII váčky, sestávajících ve své nejjednodušší podobě z komplexů pěti proteinů (Béthune and Wieland, 2018). Z malé GTPázy SAR1, komplexů proteinů SEC23 a SEC24 a z komplexu proteinů SEC13 a SEC31. Pro tvorbu COPII váčku je nejdříve nutné aktivovat GTPázu SAR1. K tomu dochází pomocí „guanine nucleotide exchange factor“ (GEF) proteinu SEC12, který umožňuje disociaci GDP ze SAR1. Poté SAR1 samovolně váže cytoplasmatické GTP, což způsobí konformační změnu vedoucí k zanoření N-terminálního konce tohoto proteinu do membrány ER. Zde SAR1-GTP rekrutuje adaptorový komplex SEC23/SEC24. SEC23 funguje jako aktivátor GTPázové aktivity (GAP) proteinu SAR1 a SEC24 interaguje s nákladem váčku. Následně dochází ke stimulaci vazby komplexů plášťových proteinů SEC13/SEC31. Výsledkem sestavení těchto komplexů na povrch ER je zakřivení membrány do takové míry, až dojde k odškrcení váčku od membrán ER. Interakce SEC31 s proteiny SEC23/SAR1-GTP stimuluje GAP aktivitu SEC23 a dochází tak k hydrolýze GTP vázaného GTPázou SAR1. To vede ke konformačním změnám, které způsobí uvolnění proteinů

COPII transportního systému z povrchu nově vytvořeného váčku (Obr. 5). Průměr typického COPII váčku je 60 nm. Existují však i modifikované verze tohoto systému, které za účasti dalších proteinů umožňují transport i daleko objemnějšího nákladu (Béthune and Wieland, 2018).

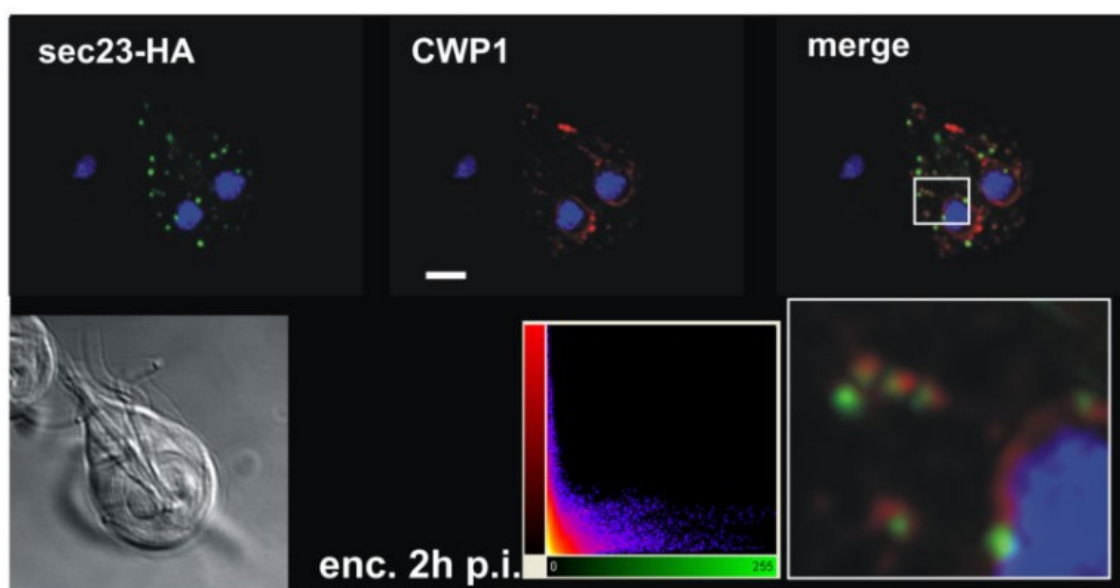


Obrázek 5: Obecné schéma znázorňující tvorbu a transport váčků k akceptorové membráně. 1) výměna GDP za GTP, vázané malou GTPázou, zprostředkované faktorem GEF. 2) vazba komplexů adaptorových a plášťových proteinů na aktivovanou GTPázu, a to buď a) postupně (v případě COPII váčků a klatrinových váčků) či b) najednou (COPI váčky). 3) deformace membrány způsobená vazbou proteinů. 4) odškrcení váčku. 5) odškrcený transportní váček. 6) uvolnění komplexů proteinů z povrchu váčku a jeho zachycení k akceptorové membráně. 7) fúze váčku s akceptorovou membránou (Béthune and Wieland, 2018).

Pozorování váčků v těsné blízkosti ER v raných fázích encystace, které velikostně odpovídají COPII váčkům, přivedlo autory k myšlence, že by ESV váčky mohly vznikat právě homotypickou fúzí COPII váčků (Marti et al., 2003a). Genom *G. intestinalis* obsahuje homology proteinů SAR1, SEC23, SEC13, SEC31 a několik paralogů proteinu SEC24, což představuje všechny nutné podjednotky pro tvorbu COPII váčků. V genomu *G. intestinalis* jsou také přítomny geny kódující proteiny z rodin SNARE proteinů a malých Rab GTPáz, které hrají roli ve fúzi váčků s cílovou membránou. V encystujících buňkách kolokalizuje s ESV několik takovýchto proteinů. Z malých Rab GTPáz je to RAB11 (Marti et al., 2003b) a RAB1 (Stefanic et al., 2009). RAB11 GTPáza byla později identifikována jako regulátor transportu ESV váčků skrz interakci s aktinovým cytoskeletem (Castillo-Romero et al., 2010). Také sem lokalizují gQa1, gQa2, gQa4, gQb5, gQc4, gR1 a gR2, které patří

do rodiny SNARE proteinů (Elias et al., 2008). Nutnost přítomnosti funkčních komponent COPII dráhy pro tvorbu ESV byla potvrzena i experimentálně (Stefanic et al., 2009).

V ERES *G. intestinalis* jsou lokalizovány proteiny nutné pro tvorbu COPII váčků a to všech tří vrstev (Faso et al., 2013; Stefanic et al., 2009). Fluorescenčně značené ERES se jeví jako nehybné body v cytoplasmě, jejichž počet není ovlivněn indukci encystace. Každá buňka obsahuje přibližně 45 takovýchto uskupení. Nejvíce asociují tyto domény ER s akumulujícími CWP proteiny kolem druhé hodiny od indukce encystace (Obr. 6). Po třetí hodině od indukce, kdy jsou již partnerné tvořící se ESV váčky, dochází ke ztrátě této asociace (Faso et al., 2013). Jiní autoři ovšem pozorovali asociaci CWP1 s ERES i v mnohem pozdějších fázích encystace, a to i u zralých ESV váčků (Zamponi et al., 2017). Shodují se však v tom, že nejvíce tyto struktury asociují v prvních krocích biogeneze ESV váčků. Tito autoři také prokázali fyzickou interakci Sec23/Sec24 komplexu s nákladem CWP proteinů (Zamponi et al., 2017).



Obrázek 6: Kolokalizace akumulujícího CWP1 (červeně) s proteinem SEC23 (zeleně), který zde představuje ERES struktury, dvě hodiny od indukce encystace. Modrá barva představuje DNA v jádrech, značenou pomocí 4',6-diamidin-2-fenylindolu (DAPI). Snímek byl pořízen laserovým konfokálním mikroskopem (Faso et al., 2013).

2.1.3.2 Maturace ESV

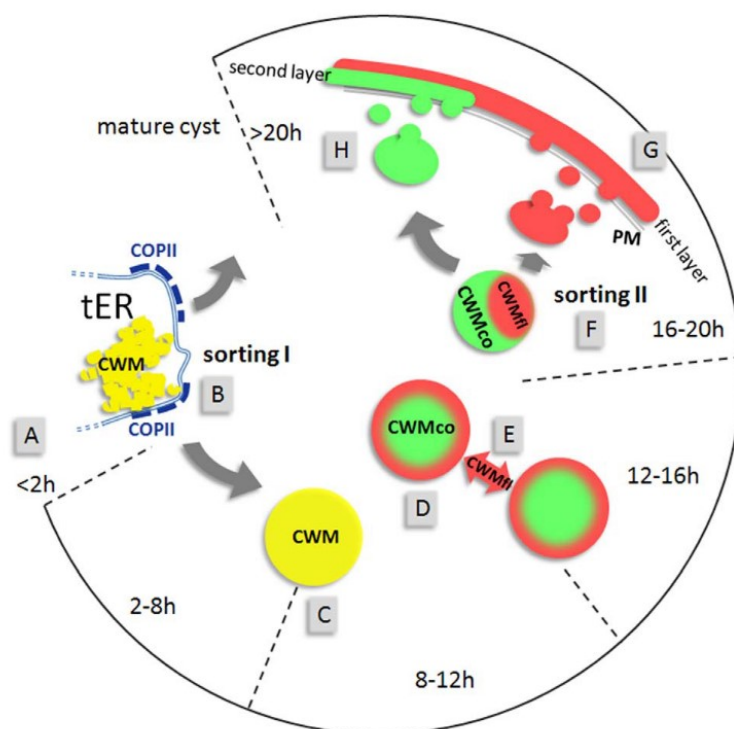
Po 5-8 hodinách od indukce encystace je dokončen export CWP proteinů z ER do ESV váčků, ale k samotné sekreci obsahu ESV váčků na povrch encystujících trofozoitů dochází až po 20-24 hodinách. V mezidobí dochází k maturaci obsahu ESV váčků (Stefanic et al., 2009). V blízkosti membrán ER, kde se vyskytují akumulující CWP proteiny, byl pozorován 26 S komplex proteasomu (Stefanic et al., 2006). Tento komplex se držel v blízkosti i nově vytvořených ESV váčků. To vedlo autory k myšlence, že by se tento komplex mohl podílet na maturaci ESV váčků. Mohl by sloužit k degradaci poškozených proteinů a účastnit se tak kontroly kvality nákladu ESV váčků. K tomu je zapotřebí, aby se proteiny určené k degradaci, dostaly na cytoplasmatickou stranu ESV váčků. V membránách ESV váčků ovšem nebyl identifikován translokační systém, který by toto umožňoval. Autoři se proto přiklání k názoru, že materiál určený k degradaci je nejprve transportován

do ER retrográdním transportem závislým na COPI mašinérii. Odtud by byl teprve translokován do cytoplasmy. Ve frakci ESV byl identifikován chaperon BiP, který by zde mohl vázat poškozené proteiny a umožňovat jejich návrat do ER. Obsahuje totiž C-terminální KDEL signální sekvenci, která zprostředkovává návrat ER rezidentních proteinů skrz COPI dráhu (Stefanic et al., 2006).

Sestavení COPI je analogické vzniku COPII váčků (Obr. 5). Malá GTPáza ARF1 je po aktivaci NEF faktorem GBF1 zasunuta svým N-terminálním koncem do membrány a iniciuje sestavení komplexu plášťových proteinů. Plášť je zde tvořen heteroheptamerickým komplexem, který je tvořen podjednotkami α -, β -, β' -, γ -, δ -, ϵ - a ζ -COP (Béthune and Wieland, 2018). V genomu *G. intestinalis* bylo nalezeno pět podjednotek komplexu COPI plášťových proteinů (α -, β -, β' -, δ - a ζ -COP) a několik členů ARF rodiny proteinů (ARF2, ARL1 a ARL2). Během encystace komplex COPI plášťových proteinů částečně lokalizuje na membránách ESV váčků (Marti et al., 2003b). Stejně tak je sem 7-14 hodin po indukci encystace naveden ARF1. Je-li poškozena funkce ARF1, nedochází k sekreci CWP proteinů na povrch encystujících trofozoitů. To dle autorů značí, že dochází k blokování zrání ESV váčků (Stefanic et al., 2009).

S tímto modelem ovšem nesouhlasí jiní autoři, kteří tvrdí, že chaperon BiP se ve zralých váčcích záměrně nevyskytuje (Zamponi et al., 2017). Navrhují jiný model, kdy by receptor pro KDEL signální sekvenci (KDEL_R) zadržoval proteiny s touto sekvencí již na úrovni ER. BiP a jiné proteiny s KDEL sekvencí by se tudíž do ESV váčků vůbec nedostávaly a nemohly by se tak účastnit navracení poškozených proteinů do ER. Jejich studie kolokalizace BiP proteinů s ESV váčky však byla provedena až po 24 hodinách od indukce encystace a váčky by v tento moment mohly být již v dalším stádiu zrání. Navíc i v tomto bodě encystace se stále vyskytovaly ESV váčky, které BiP obsahovaly. To si autoři vysvětlují zvýšenou expresí BiP během encystace, která znemožňuje zadržení veškerého BiP proteinu KDEL_R systémem v ER (Zamponi et al., 2017).

Před sekrecí materiálu stěny cysty na povrch encystujících trofozoitů musí také dojít k procesování CWP2 proteinu (Konrad et al., 2010). Zkrácená forma CWP2 se začíná objevovat 8-10 hodin po indukci encystace a k dokončení procesování tohoto proteinu dochází přibližně po 12 hodinách (Konrad et al., 2010). Na rozdíl od předešlých pozorování (Luján et al., 1995b), autoři detekovali zkrácení tohoto proteinu o pouhých 5 kDa, což odpovídá 50-60 aminokyselinám. Štěpení CWP2 časově koresponduje s rozdělením obsahu ESV váčků na dvě frakce. Kratší odštěpená C-terminální doména CWP2 kondenzuje společně s CWP3 a tvoří tak jádro váčku, které je obklopené fluidní frakcí tvořenou CWP1 a N-terminální částí CWP2. Přestože k rozdělení na fluidní a kondenzovanou frakci dochází i v případě zablokování štěpení CWP2 proteinu, takto vzniklé cysty postrádají rezistenci k osmotickému tlaku vodního prostředí. 14–16 hodin po indukci encystace je patrná separace obou těchto frakcí do oddělených váčků (Obr. 7). Váčky obsahující fluidní frakci byly lokalizovány v periferních částech buňky. Váčky s kondenzovanou frakcí byly lokalizovány více centrálně. Jak k tomuto rozdělení do separovaných organel dochází nebylo zjištěno. Předpokládá se ovšem účast klatrinových váčků, jelikož klatrin se nachází na povrchu ESV váčků s kondenzovaným jádrem (Konrad et al., 2010).



Obrázek 7: Model maturace ESV váčků a následná sekrece jejich obsahu na povrch buněk. CWP proteiny jsou syntetizovány v ER (A) a následuje tvorba ESV váčků z ERES (B). ESV váčky se zvětšují, dokud všechn materiál stěny cysty (CWM) není exportován z ER (C). Obsah váčku se rozdělí na dvě frakce: kondenzované jádro (CWMco) a fluidní část (CWMfl) (D). Probíhá výměna CWMfl mezi jednotlivými ESV váčky tubulárními spoji (E). Dvě frakce ESV se rozdělí do separátních kompartmentů (F). CWMfl je rychle sekretována a tvoří první vrstvu stěny cysty (G). CWMco je sekretována během několika následujících hodin a tvoří druhou vrstvu stěny cysty (H). Časy vyznačené u jednotlivých fází vyjadřují dobu uplynulou od indukce encystace (Konrad et al., 2010).

Klatrinové váčky jsou formovány za účasti ARF1, adaptorových proteinů (AP) a vlastních klatrinových molekul (Obr. 5). K jejich odštěpení od donorové membrány je zapotřebí GTPázy dynaminu. Dynamin polymerizuje kolem krčku, který spojuje tvořící se váček a donorovou membránu. Hydrolýzou GTP dochází k jeho konformační změně vedoucí k vlastnímu odškrcení váčku (Brodsky, 2012). V genomu *G. intestinalis* se nachází ortology všech těchto proteinů. Komponenty klatrinových váčků, těžký řetězec klatrinu (CLH) a ortolog dynaminu (DRP), se během encystace nachází na povrchu ESV váčků (Marti et al., 2003b). Bylo také dokázáno, že pro sekreci CWP proteinů je nutná přítomnost funkčních proteinů ARF1 (Stefanic et al., 2009), AP1 (Touz et al., 2004), AP2 (Rivero et al., 2010) a DRP (Gaechter et al., 2008). V encystujících trofozoitech s nefunkční variantou DRP se v pozdních fázích encystace objevují extrémně velké, klatrinem obalené ESV váčky s vytvořeným kondenzovaným jádrem. To naznačuje přímou roli dynaminu a klatrinových váčků v separaci jednotlivých frakcí ESV váčků do oddělených kompartmentů (Gaechter et al., 2008; Konrad et al., 2010).

CWP2 je procesován cysteinovou endopeptidázou CP2, která je během encystace lokalizována v ESV váčcích. Jelikož tento enzym je schopný CWP2 zcela degradovat, je nutné jeho aktivitu určitým způsobem regulovat. To by mohlo být dosaženo jeho zpožděnou aktivací či acidifikací ESV váčků případným splynutím s periferními vakuolami (PV). CP2 totiž vykazuje optimální proteázovou aktivitu při neutrálním pH (DuBois et al., 2008). S CWP2 ovšem během encystace kolokalizuje i další cysteinová proteáza ESCP, která se v neencystujících trofozoitech nachází v PV. I tato proteáza by tak mohla hrát roli v procesování tohoto proteinu či se jiným způsobem

podílet na maturačních procesech (Touz et al., 2002b). Navržen byl i model fúze ESV váčků s váčky obsahujícími proteázu, která je odpovědná za proteolytické štěpení CWP2 proteinu (Krtková et al., 2016). V tomto procesu by mohla hrát roli signalizace řízená GTPázou RAC z rodiny Rho GTPáz. Přesný mechanismus této signalizace ovšem dosud není znám (Krtková et al., 2016).

Během maturace se mezi ESV váčky tvoří přechodné tubulární struktury, které je propojují a umožňují tak mezi nimi výměnu jejich komponent (Obr. 2). To by mohlo napomáhat synchronizaci maturačních procesů skrz celou síť ESV váčků. Na tvorbě těchto tubulárních struktur by se mohly podílet i membrány ER (Stefanic et al., 2009). Jakmile ovšem dojde k vytvoření kondenzovaného jádra ESV váčků, transport mezi váčky je omezen na jejich fluidní část (Stefanic et al., 2009; Konrad et al., 2010).

2.1.3.3 Sekrece CWM

První vrstva stěny cysty je sekretována 16 hodin od indukce encystace. Tato vrstva je tvořena pouze fluidní frakcí, která byla obsažena v periferně lokalizovaných ESV váčcích. Sekrece první vrstvy stěny cysty, která je tvořená CWP1 a N-terminální částí procesovaného CWP2, probíhá současně s morfologickými přestavbami vedoucími k tvorbě cysty (Konrad et al., 2010). Koreponduje také se ztrátou schopnosti adheze. Druhá vrstva obsahující kondenzovanou frakci ESV váčků, která obsahuje CWP3 a C-terminální část procesovaného CWP2, je sekretována pomaleji v časovém rozmezí 16-24 hodin od indukce encystace (Obr. 7). Autoři předpokládají, že pomalejší kinetika tvorby druhé vrstvy by mohla být způsobena nutností dekonenzace frakce před sekrecí (Konrad et al., 2010). Vlastní sekrece první vrstvy stěny cysty probíhá dosud neznámým mechanismem za účasti GTPázy RAC. Sekretovaný protein CWP1 je schopný se vázat i na ostatní encystující trofozoity v populaci (Krtková et al., 2016). Schopnost upotřebení sekretovaného CWP1 proteinu dalšími buňkami v populaci by mohla vysvětlovat, proč je encystace efektivnější v populacích s větší hustotou (Gillin et al., 1987; Krtková et al., 2016).

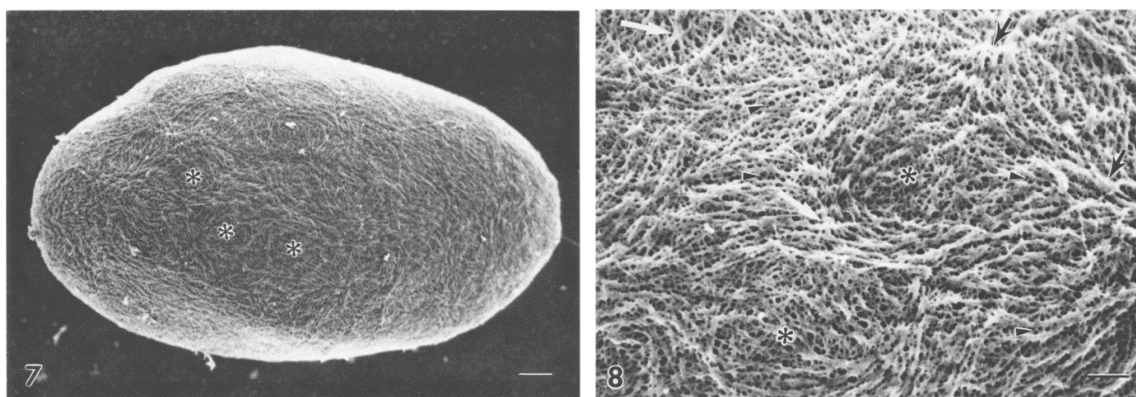
V ESV váčcích se nachází protein GSP, který má na svém C-konci Ca^{2+} vazebnou doménu. Přítomnost tohoto proteinu se zdá být důležitá pro sekreci obsahu ESV váčků na povrch encystujících trofozoitů. Autoři předpokládají, že tento protein zde funguje jako senzor hladiny Ca^{2+} a mohl by dosud neznámým mechanismem regulovat sekreci CWM (Touz et al., 2002a).

2.1.4 ECV váčky

Během encystace se v *G. intestinalis* tvoří ještě druhý typ váčků. Tyto váčky obsahují GalNAc homopolymer a jsou sekretovány na povrch encystujících trofozoitů v brzkých fázích encystace (Chatterjee et al., 2010). GalNAc obsahující váčky byly později označeny názvem „encystation carbohydrate-positive vesicles“ (ECV váčky). Velikostně se pohybují mezi 0,2—2 μm . Pod TEM se jeví jako světlé váčky s hladkým obsahem. Objevují se všude v cytoplasmě, nejvíce však v blízkosti plasmatické membrány. Zdá se, že podobně jako ESV váčky pučí ECV váčky z ER. Je možné je pozorovat pouze v encystujících trofozoitech. Ve zralých cystách se již nevyskytují (Midle et al., 2013).

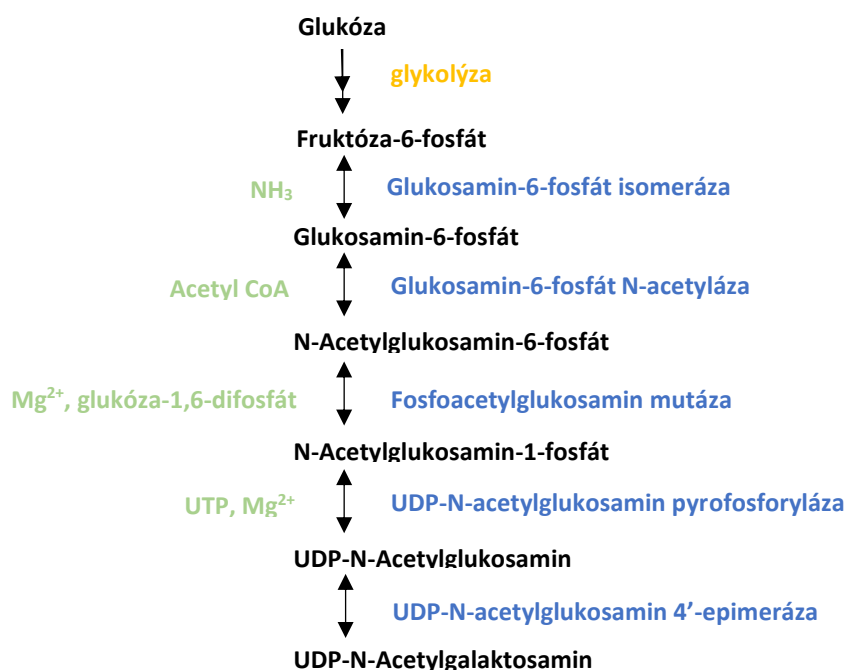
2.1.5 Struktura a složení stěny cysty

Stěna zralé cysty, jejíž tloušťka se pohybuje kolem 250 nm, se skládá ze tří membrán a vnější sítě fibril. K vnější membráně přiléhá síť filament. Vnitřní membrány obklopují peritrofický prostor (Schupp et al., 1988). Jednotlivá vlákna o tloušťce 7-20 nm tvoří pevně sbalenou síť. Dlouhá vlákna o větším průměru jsou propojována krátkými vláknitými spojkami (Obr. 8). Vnější membrána je od prostřední membrány oddělena tenkou vrstvou cytoplasmy (Erlandsen et al., 1989). Vnější membrána je tvořena plasmatickou membránou encystující buňky. Vnitřní membrány jsou tvořeny membránou vakuol, které se tvoří během encystace pod povrchem plasmatické membrány. Jakmile je sekretován CWM, vakuoly se začínají hromadit těsně pod povrchem encystujících trofozoitů, postupně se zvětšují, tvoří zploštělé vaky a přiléhají k plasmatické membráně. Nakonec postupnou fúzí vytvoří jeden vak obklopující cytoplasmu, kde vnitřní strana vakuoly tvoří plasmatickou membránu budoucího excyzoita. Tímto způsobem se mezi cytoplasmou a stěnou cysty vytvoří extracelulární peritrofický prostor. V konečné fázi se tento prostor zhroutí a vytvoří se tak soustava tří membrán obklopená sítí filament tvořící stěnu cysty (Chávez-Munguía et al., 2004).



Obrázek 8: Snímky ze snímacího elektronového mikroskopu (SEM) zobrazující strukturu stěny cysty *G. intestinalis*. Hvězdičky značí oblasti, které jsou tvořené do spirály stočenými vlákny. Obrázek nalevo — povrch cysty. Měřítka: 0,5 μ m. Obrázek napravo znázorňuje zvětšený obraz cysty ze snímku nalevo. Krátké vláknité spojky propojují delší vlákna o větším průměru (značené černými trojúhelníky). Černé šipky ukazují na ztlustělá vlákna, které vyčnívají z povrchu. Bílé šipky ukazují na větvičí se vlákna. Měřítka: 0,1 μ m (Erlandsen et al., 1989).

Stěna cysty se skládá z 63 % ze sacharidů a z 36 % z proteinů. Sacharidová složka stěny cysty se skládá z $\beta(1-3)$ -D-GalNAc homopolymeru. Silné interakce mezi jednotlivými řetězci tohoto polysacharidu a proteinových složek jsou pravděpodobně zodpovědné za silně nerozpustný charakter stěny cysty (Gerwig et al., 2002). $\beta(1-3)$ -D-GalNAc homopolymer je syntetizovaný z glukózy, která je přijímána z okolí buněk. Nejprve je glukóza pomocí glykolytických enzymů konvertována na fruktózu-6-fosfát. Dále následuje dráha pěti enzymů, která fruktózu-6-fosfát konvertuje na UDP-GalNAc (Obr. 9) (Macechko et al., 1992). Transkripce genů těchto pěti enzymů je aktivována během encystace (Lopez et al., 2003; Van Keulen et al., 1998). Začlenění UDP-GalNAc do vláknité struktury stěny cysty má na svědomí enzymová aktivita syntázy stěny cysty (CWS) (Karr and Jarroll, 2004).



Obrázek 9: Schéma znázorňující dráhu vedoucí k syntéze UDP-N-Acetylglaktosaminu z glukózy. První dvě reakce této dráhy jsou součástí glykolýzy a mají za následek vznik fruktóza-6-fosfátu. Modře jsou vyznačeny enzymy účastníci se této dráhy, zeleně jsou vyznačeny kofaktory či další substráty a černě produkty a meziprodukty této dráhy (Macechko et al., 1992).

2.1.6 Morfologické změny během encystace

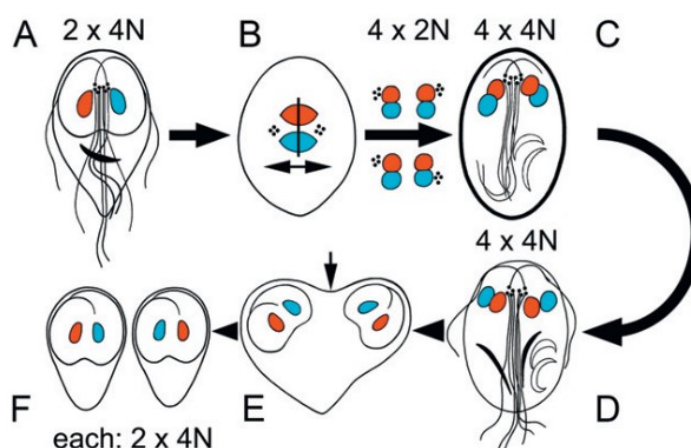
První pozorovatelnou změnou během encystace je tvorba ESV váčků. Během prvních šesti hodin encystace se jejich počet několikanásobně zvýší (Faubert et al., 1991). V průběhu prvních deseti hodin encystace dochází k postupnému zakulacení původně hruškovitých trofozoitů. Postupně dochází ke zduření okrajových částí trofozoitů a k tvorbě konkávní prohlubně ve ventrální části buňky (Midlejš and Benchimol, 2009). V této fázi se také různě po povrchu začínají objevovat výčnělky obsahující materiál stěny cysty. Oblasti pokryté tímto materiálem se postupně zvětšují v následujících několika hodinách. V této fázi se navíc často vyskytují dělící se trofozoiti. I dceřiné buňky mají na povrchu materiál stěny cysty. Po 14 hodinách se již zcela běžně vyskytují nezralé cysty zcela pokryté vláknitou stěnou, které ovšem stále mají jeden či dva bičíky. Tyto bičíky jsou rovněž kryté vláknitým materiálem stěny cysty. Po 16 hodinách je již možné pozorovat zrale vypadající cysty. Celý proces je v rámci populace asynchronní, jelikož i po delší indukci jsou stále viditelní encystující trofozoiti v různých fázích diferenciaci. (Erlandsen et al., 1996). Sekrece proteinů stěny cysty předchází tvorbě sítě fibril z GalNAc polymeru (Arguello-Garcia et al., 2002). Cysty sklizené po 24 hodinách encystace nejsou zcela uzavřené a je na nich viditelné operkulum, prohlubeň, která značí místo uzavření cysty. Tato struktura ovšem u zcela zralých cyst mizí (Midlejš and Benchimol, 2009).

Během encystace také dochází k postupné internalizaci bičíků. První jsou internalizovány ventrální bičíky, které jsou obklopovány zduřelými okrajovými částmi encystujících trofozoitů.

Jako poslední jsou internalizovány kaudální bičíky. Internalizované bičíky se v encystujících buňkách a následně i v cystách vyskytují ve vnitřních vakuolách (Midlej and Benchimol, 2009). Během encystace nedochází ke zdvojení bičíků tak, jak je tomu u dělicích se buněk (Jiráková et al., 2012).

První strukturní změny adhezivního disku byly pozorovány již 1–2 hodiny od indukce encystace, kdy se disk posteriorně otevírá a vytváří tak tvar podkovy. Čtyři hodiny od indukce encystace se otevírá do spirálovité podoby. Tyto změny jsou spojeny se ztrátou schopnosti adheze a uvolňování buněk do okolního prostředí. 12 hodin od indukce encystace dochází k fragmentaci disku, přičemž jednotlivé fragmenty jsou později uschovány v cytoplasmě cysty (Palm et al., 2005). Ztráta schopnosti se znovu přichytit k podkladu byla také pozorována již před zakulacením buněk během prvních 12 hodin encystace (Faubert et al., 1991). Pozdější studie ovšem spojují ztrátu schopnosti adheze až se sekrecí CWM (Konrad et al., 2010).

K dělení jader dochází v zakulacených buňkách, které již neadherují. Tyto buňky jsou bohaté na glykogen, mají nefragmentovaný disk, stále obsahují ESV váčky a nemají viditelnou stěnu cysty. Jádra se dělí semi-otevřenou mitózou, kdy nedochází k rozpadu jaderné membrány. Vznikají tak čtyři jádra, které tvoří dva páry jader, která jsou vzájemně v těsné blízkosti (Jiráková et al., 2012). Spárovaná, nesesterská jádra jsou propojena mezijadernými můstky, které umožňují výměnu genetického materiálu (Poxleitner et al., 2008). Po rozdělení jader dochází k replikaci DNA (Obr. 10) (Jiráková et al., 2012).



Obrázek 10: Model encystace a excystace *G. intestinalis*. A) Dvoujaderný trofozoit v G2 fázi životního cyklu zahajuje encystaci. B) Dělení jader v nezralé cystě. Čtveřice teček reprezentuje pozici bazálních tělísek, které nejsou duplikovány. Nesesterská jádra tvoří pár, který je propojen mezijadernými můstky. C) V cystě dochází k replikaci DNA. D) Během excystace dochází k cytokinezi excyzoita (směr cytokineze naznačen šipkou). Oba noví jedinci obdrží pár nesesterských jader a formují se adhezivní disky. F) Nově excystovaní jedinci, kteří jsou připraveni k mitotickému dělení (Jiráková et al., 2012).

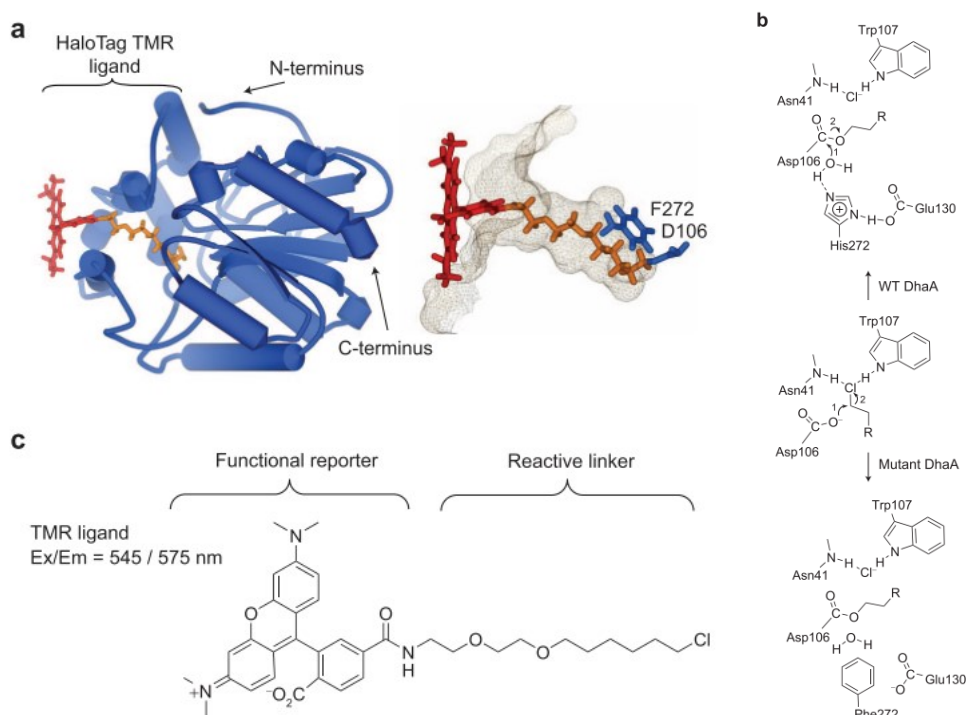
2.2 Enzymatické tagy pro live-imaging

Pravděpodobně nejhojněji užívaným fluorescenčním tagem v živých eukaryotických systémech je „green fluorescent protein“ (GFP). Ten však pro vznik vlastního fluoroforu uvnitř proteinové struktury vyžaduje přítomnost molekulárního kyslíku (Heim et al., 1994). To se jeví jako velmi

problematický požadavek v anaerobních organismech. Přísun kyslíku je pro *G. intestinalis* při jejich kultivační teplotě 37 °C škodlivý. V některých studiích, které využívají expresi GFP v *G. intestinalis*, bylo toto úskalí částečně vyřešeno zchlazením buněčných kultur na 4 °C před jejich vystavením atmosféře obohacené na kyslík (Hehl et al., 2000). Později bylo ovšem ukázáno, že zchlazení *G. intestinalis* pod 15 °C vede k blokování exportu CWP proteinů z ER (Marti et al., 2003a). Proto je třeba hledat vhodnější alternativy, které ke své funkci kyslík nepotřebují a neovlivňují tak průběh encystačních dějů.

2.2.1 HaloTag

HaloTag byl vytvořen řízenou mutagenézí přirozeně se vyskytujícího enzymu haloalkan dehalogenázy (DhaA), který katalyzuje hydrolýzu haloalkanu na primární alkohol a halogenid. Tato enzymatická reakce se sestává ze dvou kroků. Nejprve dochází ke kovalentní vazbě substrátu na aspartát enzymu. Následuje hydrolýza tohoto meziproductu, kdy se uvolňuje alkohol a dochází k regeneraci enzymu. Tuto katalýzu zprostředkovává histidin na pozici 272. Mutace této aminokyseliny na fenylalanin znemožňuje hydrolýzu meziproductu a substrát tak zůstává kovalentně spojen s enzymem (Obr. 11b). Chloroalkan, který slouží jako substrát tohoto enzymu může být konjugován s řadou různých reportérů či afinitních tagů. Jedním z takovýchto reportérů je tetramethylrhodamin (TMR) používaný jako fluorofor ve fluorescenční mikroskopii (Obr. 11c). Ligand konjugovaný s TMR dokáže prostupovat buněčnými membránami a nevykazuje toxické účinky na buněčné procesy. Fúze tohoto enzymatického tagu s proteinem zájmu tak umožňuje



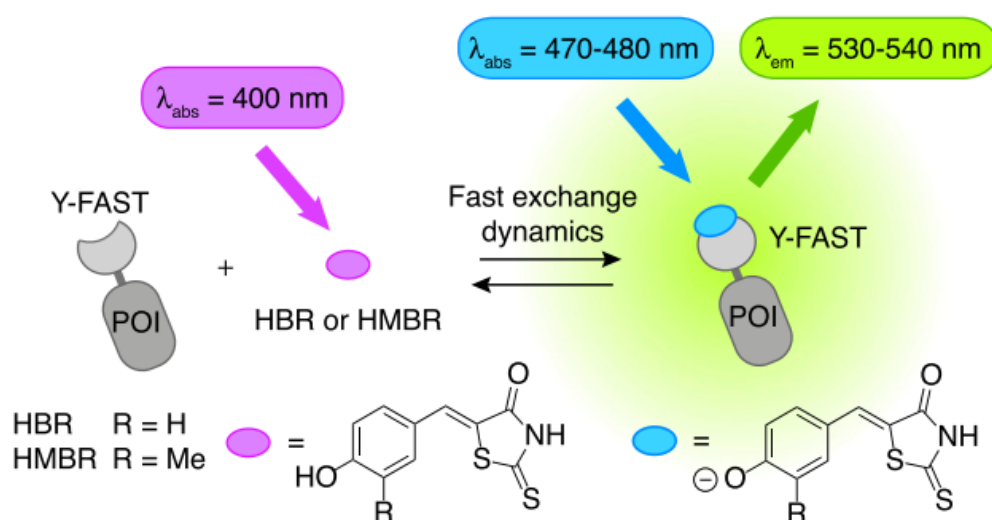
Obrázek 11: Přehled enzymatického systému HaloTag. A) Model enzymu HaloTag a katalytického místa, kam se váže TMR ligand. B) Porovnání mechanismů enzymatické reakce u přirozeně se vyskytující DhaA a mutantní dehalogenázy. V přirozené formě katalyzuje His hydrolýzu meziproductu. Dojde-li k záměně His za Phe, meziproduct zůstává kovalentně navázan na enzym. C) struktura TMR ligandu (Los et al., 2008)

dlouhodobé pozorování daného proteinu v živých buňkách. Díky kovalentní vazbě mezi enzymem a fluorescenčním substrátem je možné buňky i fixovat a kombinovat tak tuto metodu s imunofluorescenčním značením (Pries et al., 1995; Los et al., 2008).

V předešlých studiích bylo ukázáno, že konstrukty, které obsahují fúzní proteiny s HaloTagem, jsou v *G. intestinalis* funkční a nezpůsobují růstové defekty. To naznačuje, že tyto konstrukty nenarušují metabolické děje anaerobních organismů (Martincová et al., 2012).

2.2.2 Y-FAST

Y-FAST neboli „yellow fluorescence-activating and absorption-shifting tag“ byl vytvořen z existujícího proteinového tagu „photoactive yellow protein“ (PYP) (Plamont et al., 2016). PYP byl modifikován tak, aby výsledný enzym reverzibilně vázal 4-hydroxybenzyliden-rhodanin (HBR) a 4-hydroxy-3-methylbenzyliden-rhodanin (HMBR), které v tomto systému slouží jako fluorogeny. Tyto fluorogeny samy o sobě vykazují zanedbatelnou fluorescenci a nevytvářejí tak pozadí při pozorování. HMBR i HBR jsou schopné prostupovat buněčnými membránami a při používaných koncentracích nejsou pro živé systémy toxické. Při deprotonaci vykazují HBR/HMBR posun ve svém absorpčním spektru o 50 nm vlnové délky. HMBR vykazuje v komplexu s tagem Y-FAST čtyřikrát vyšší intenzitu fluorescence než HBR, čímž se vyrovnává běžným fluorescenčním proteinům. Y-FAST je schopný vázat deprotonované formy těchto substrátů a jejich imobilizací zvýšit jejich kvantový výtěžek (Obr. 12). Y-FAST je 14 kDa velký protein, což činí přibližně polovinu velikosti GFP podobných proteinů. To by mělo minimalizovat jeho vliv na funkci proteinů, se kterými je fúzován. I v milimolárních koncentracích se vyskytuje jako monomer, což zamezuje jeho nechtěnou oligomerizaci při jeho vyšších hustotách v živých systémech. Vlastnosti tohoto systému umožňují pozorování i nově nasyntetizovaných proteinů díky rychlé vazbě enzymu a substrátu po syntéze značeného proteinu. Bylo také ukázáno, že značení pomocí tohoto systému je možné v rozpětí pH 5.5–8, což umožňuje značení ve většině organel (Plamont et al., 2016).



Obrázek 12: Schéma znázorňující vazbu H(M)BR substrátu na protein zájmu (POI) fúzovaný s proteinovým tagem Y-FAST. Vazba substrátu na enzym vyvolává prostřednictvím ionizace substrátu dvě spektroskopické změny: zvýšení kvantového výtěžku a posun v absorpčním spektru substrátu (Plamont et al., 2016).

3 Cíle práce

Hlavním cílem práce bylo sledování dynamiky encystačních procesů *G. intestinalis in vivo* prostřednictvím enzymaticky značených chimerických proteinů.

Praktické cíle:

1. Vytvoření konstruktů pro *in vivo* pozorování encystace
2. Ověření funkčnosti enzymatického značení chimerických proteinů *in vivo*
3. Optimalizace pozorovacích podmínek
4. Vizualizace dynamiky encystačních váčků a dalších buněčných struktur během encystace *in vivo*

4 Materiál a metodika

4.1 Organismy a použitá média

4.1.1 *Escherichia coli*

Pro namnožení plazmidů byly použity chemicky kompetentní bakterie *E. coli* kmene TOP 10. Bakterie byly kultivovány při teplotě 37 °C v LB médiu se selekčním antibiotikem ampicilinem (Sigma; finální koncentrace 100 µg/ml) na třepačce (220 rpm).

Pro selekci jednotlivých klonů transformovaných bakterií byly bakterie kultivovány na agarových LB plotnách v termostatu při teplotě 37 °C.

Transformované bakterie jsou dlouhodobě uchovávány zamražené v -80 °C s 20% obsahem glycerolu.

4.1.2 *Giardia intestinalis*

Rekombinantní proteiny byly exprimovány v transfekovaných trofozoitech *G. intestinalis* kmene WB (ATCC 30957 a ATCC 50803/C6). Axenická kultura trofozoitů byla kultivována při 37 °C v modifikovaném médiu TYI-S-33 (Keister, 1983) s přidáním 10% hovězím sérem (Gibco) a 0,1% hovězí žlučí. Pro selekci transfekovaných linií, byly buňky kultivovány v médiu s přidáním selekčním antibiotikem – puromycinem (PAA laboratories; finální koncentrace 54 µg/ml) nebo G418 (Gold biotechnology; finální koncentrace 0,6 mg/ml). Buňky byly očkované jednou za 3-4 dny.

Transformovaní trofozoiti jsou dlouhodobě uchováváni zamražení v dusíku s 0,25% obsahem dimethylsulfoxidu.

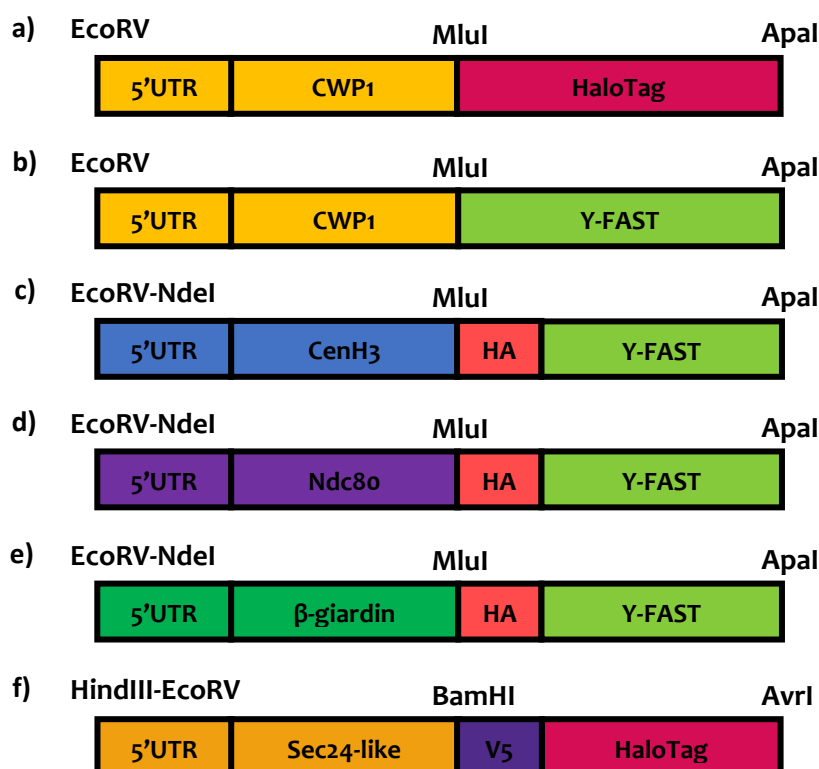
Složení média:

TYI-S-33	1 l
dH ₂ O	870 ml
BBL™ Trypticase™ Pepton (BD)	20 g
Extrakt z kvasinek (Oxiod)	10 g
Glukóza (Sigma)	10 g
NaCl (Sigma)	2 g
K ₂ HPO ₄ (Lachema)	1 g
KH ₂ PO ₄ (Lachema)	0,6 g
L-cystein (Sigma)	2 g
Kyselina askorbová (Sigma)	0,2 g
Citrát železito-ammonný (Sigma)	0,0228 g
10% inaktivované hovězí sérum (Gibco)	100 ml
0,1% hovězí žluč (z jatek)	1 ml
Penicilin-Streptomycin (Sigma)	10 ml

Před přidáním hovězího séra je nutné upravit pH pomocí NaOH na PH 6,8. Hotové médium je nutno sterilizovat filtrací (Filter Steritop 0,22 µm, Millipore). Médium se uchovává v -20 °C.

4.2 Plazmidy

Pro transfekci *G. intestinalis* byl použit modifikovaný plazmid pTG (Martincová et al., 2012), do kterého byly vloženy proteiny CWP1 (GL50803_5638) s nativním promotorem (150 bp 5'UTR), fúzané s enzymatickými tagy HaloTag (Obr. 13a) nebo Y-FAST (Obr. 13b). Do stejného plazmidu byly vloženy také proteiny CenH3 (GL50803_20037; Obr. 13c), Ndc80 (GL50803_32786; Obr. 13d) a β-giardin (GL50803_4812; Obr. 13e) s nativními promotory (150 bp 5'UTR), fúzané s enzymatickým tagem Y-FAST, který byl na N-konci označen hemaglutinínovým tagem (HA). Pro ko-expresi s konstruktem CWP1-Y-FAST-pTG byl použit plazmid pUC57-mini (GenScript) s nasyntetizovanou 150 nukleotidů dlouhou 3'UTR oblastí dynaminu (GL50803_14373) a kazetou s rezistencí na G418, do kterého byl vložen gen Sec24-like (GL50803_16520; Obr. 13f) s nativním promotorem (160 bp 5'UTR) a s enzymatickým tagem HaloTag, označeným tagem V5 (Obr.13). Veškeré predikce molekulové hmotnosti fúzních proteinů byly provedeny dle nukleotidové sekvence genů fúzních proteinů prostřednictvím predikčního programu dostupného na webových stránkách http://www.genecorner.ugent.be/protein_mw.html.



Obrázek 13: Schéma znázorňující jednotlivé fúzní proteiny s jejich přirozenými promotory: a) CWP1-HaloTag, b) CWP1-Y-FAST, c) CenH3-HA-Y-FAST, d) Ndc80-HA-Y-FAST, e) β-giardin-HA-Y-FAST, f) Sec24-like-V5-HaloTag. Na jednotlivých schématech jsou vyznačena restrikční místa, která byla použita pro vložení genů do plazmidů.

4.3 Amplifikace genů a izolace

Geny byly amplifikovány metodou Polymerase Chain Reaction (PCR). Jako templát pro amplifikaci genů sledovaných proteinů byla použita genomová DNA (gDNA) *G. intestinalis*, která byla izolována z buněk pomocí kitu „Genomic DNA Mini Kit“ (Geneaid). Plazmidy GrpE-Y-FAST-pTG a GrpE100-Halo-pTG, které poskytl Mgr. Luboš Voleman Ph.D., sloužily jako templát pro amplifikaci enzymatických tagů, Y-FAST a HaloTag. Primery byly vytvořeny dle sekvencí amplifikovaných genů, získaných z databáze GiardiaDB (www.giardiaDB.org). Do sekvence primerů všech amplifikovaných úseků byly zahrnuty restrikční místa pro vložení do plazmidů. Forward primery enzymatických tagů pro veškeré konstrukty kromě těch, které obsahují sekvenci CWP1, také obsahovaly epitopické tagy HA či V5. Pro expresi fúzovaných proteinů bylo nutné ze sekvencí sledovaných proteinů vynechat sekvenci STOP kodonů a sekvenci START kodonu ze sekvencí enzymatických tagů. Části fúzních proteinů byly klonovány postupně.

Primery amplifikovaných genů:

CWP1 (GL50803_5638) s promotorovou oblastí (150 bp)	
Forward (restrikční místo: EcoRV)	CAAG GATATC GACAACGGCTTACTAAATCAT
Reverse (restrikční místo: MluI)	CAAG ACGCGT AGGCGGGGTGAGGCAGTACTC

HaloTag	
Forward (restrikční místo: MluI)	CAAG ACGCGT GGATCCGAAATCGGTACAGG
Reverse (restrikční místo: Apal)	CAAG GGGCCCTT AGCCGCCAGCCCCGGGGA

Y-FAST	
Forward (restrikční místo: MluI)	CAAG ACGCGT GAACATGTTGCCTTTGGTAGCG
Reverse (restrikční místo: Apal)	CAAG GGGCCCTT TATACCCTTTTGACAAACACC

β-giardin (GL50803_4812) s promotorovou oblastí (160 bp)	
Forward (restrikční místa: EcoRV-NdeI)	CAAG GATATCCATATG TCTTGTGACGCCGAAGCACGA
Reverse (restrikční místo: MluI)	CAAG ACGCGT GTGCTTTGTGACCATCGAGAG

CenH3 (GL50803_20037) s promotorovou oblastí (160 bp)	
Forward (restrikční místa: EcoRV-NdeI)	CAAG GATATCCATATG GGGAGAGCTTGCTTCACACG
Reverse (restrikční místo: MluI)	CAAG ACGCGT CCGTAGTGAATTTAAGTTGCG

GINdc80 (GL50803_32786) s promotorovou oblastí (150 bp)	
Forward (restrikční místa: EcoRV-NdeI)	CAAGGATATCCATATGTAAGATCAAAGGGCTGGGAGA
Reverse (restrikční místo: MluI)	CAAGACGCGTACGCTTTTGACGCTGAAACAT

Y-FAST-HA (HA tag označen červeně), reverse primer jako u Y-FAST	
Forward (restrikční místo: MluI)	CAAGACGCGT TACCATACGATGTTCCAGATTACGCT -GAACATGTTGCCTTTGGTAGCG

Sec24-like (GL50803_16520) s promotorovou oblastí (160 bp)	
Forward (restrikční místo: MluI)	CAAGACGCGTTTCTCGTCGAAGGGCAAGC
Reverse (restrikční místo: BamHI)	CAAGGGATCCCGCAGCACCAATTGCCGTT

HaloTag-V5 (V5 označen červeně)	
Forward (restrikční místa: HindIII-MluI-BamHI)	CAAGAAGCTTACGCGTGGATCC GGCAAGCCTATAC-CAAACCCTCTCCTCGGACTAGATTCCA-CA GGCTCCGAAATCGGTACAGGC
Reverse (restrikční místo: AvrI)	CAAGCCTAGGTTAGCCGCCAGCCCGGGGA

PCR reakce (25 µl):

Q5 Hot Start Polymeráza (NEB)	1 µl
Q5 pufr (NEB)	5 µl
dNTP (Fermentas)	0,5 µl
Forward primer (10µM)	1 µl
Reverse primer (10µM)	1 µl
templátová DNA – gDNA/plazmid*	0,5/1 µl
dH ₂ O	x µl

*plazmidová DNA z miniprepů byla 100x naředěna

Gen Sec24-like se nepodařilo amplifikovat pomocí uvedené reakce. Byla proto pro amplifikaci vybrána polymeráza PrimeStar.

Sec24-like – PCR reakce (20 µl):

PrimeStar Premix (TaKaRa)	10 µl
Forward primer (10µM)	1 µl
Reverse primer (10µM)	1 µl
gDNA	0,5 µl
dH ₂ O	7,5 µl

PCR program:

1.	98 °C	30 s	1x
2.	98 °C	8 s	20 x
3.	65 °C	15 s	
4.	72 °C	45 s (90 s pro amplifikaci Sec24-like)	
5.	98 °C	8 s	15x
6.	45 °C	15 s	
7.	72 °C	45 s (90 s pro amplifikaci Sec24-like)	
8.	72 °C	5 min	1x
9.	15 °C	∞	1x

Amplifikovaná DNA byla analyzována na 1% agarózovém gelu s přidáním interkalačním barvivem SYBRTM Safe (Invitrogen) na horizontální elektroforéze. Detekována byla prostřednictvím UV transiluminátoru. Před nanesením na gel bylo do vzorků přidáno 6x koncentrované nanášecí barvivo (Thermo Scientific). Velikost fragmentů byla určena porovnáním se standardem Gene-Ruler DNA Ladder (Thermo Scientific).

DNA byla z gelu izolována pomocí High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) dle přiloženého návodu.

4.4 Klonování DNA fragmentů

Amplifikované inzerty i plazmidy byly naštěpeny příslušnými restrikčními endonukleázami (NEB) dle protokolu. Inzerty byly izolovány prostřednictvím High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) dle přiloženého návodu. Plazmidy byly nejprve analyzovány na 1% agarózovém gelu a následně izolovány již popsáním způsobem. Inzerty byly zaligovány do plazmidů za použití T4 DNA ligázy (NEB) dle uvedeného protokolu 16 hodin přes noc při teplotě 16 °C.

Ligační reakce byla přidána k 150 µl chemicky kompetentním bakteriím *E. coli* po jejich rozmražení a reakce byla ponechána 20 minut na ledě. Posléze byly bakterie transformovány teplotním šokem o teplotě 42 °C po dobu 40 sekund. Reakce byla vrácena na dvě minuty na led. Po přidání 250 µl SOC média byla reakce inkubována při teplotě 37 °C na třepačce (220 rpm) po dobu jedné hodiny. Transformované bakterie byly vysety na agarových LB plotnách s 30 µl selekčního antibiotika ampicilinu (100 mg/ml) a kultivovány přes noc v termostatu při teplotě 37 °C.

Několik vybraných kolonií bylo vždy otestováno na přítomnost genu prostřednictvím PCR za použití specifických primerů a analyzováno na agarózovém gelu. Vybrané pozitivní kolonie byly přes noc kultivovány v 5 ml LB média se selekčním antibiotikem (0,1 mg/ml) na třepačce (220 rpm) při teplotě 37 °C. Z bakterií byl plazmid izolován prostřednictvím High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) dle přiloženého návodu. Koncentrace plazmidů byla změřena na přístroji NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

Přítomnost inzertu byla ověřena pomocí kontrolní restrikce dle daného protokolu příslušnými restrikčními enzymy a při pozitivním výsledku byl inzert osekvenován kvůli detekci případných mutací.

Vybrané kolonie byly nasazeny do 80 ml LB média se selekčním antibiotikem ampicilinem (finální koncentrace 100 µg/ml) a vloženy na 16 hodin na třepačku (220 rpm, 37 °C). Plazmid byl izolován dle přiloženého návodu pomocí Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System Kit (Promega). Koncentrace midiprepu byla změřena na přístroji NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

4.5 Transfekce trofozoitů *G. intestinalis*

Po kultivaci trofozoitů v 50ml kultivační lahvi, bylo z lahve slito kultivační médium a nahrazeno vychlazeným sterilním PBS. Buňky byly na 20 minut ponechány na ledu. Po řádném protřepání flásky, byly buňky přelity do 50 ml falkony a na 10 minut stočeny při 1000 x g a 4 °C. PBS bylo slito a pelet byl resuspendován v 1 ml TYI-S-33 média. Byla změřena koncentrace buněk na cytometru (Beckman Coulter) a suspenze buněk byla médiem doředěna na koncentraci $3,33 \times 10^7$ buněk/ml.

Do 4mm elektroporační kyvety (BioRad) bylo napipetováno 300 µl suspenze buněk a 50 µg plazmidové DNA. Kyvety s buňkami byly na 15 minut vloženy na led. Posléze byly buňky elektroporovány použitím dvou různých programů Time Constant Protocol (350 V, 175 ms) a Exponential Protocol (350 V, 1500 µF, 750 Ω) na přístroji GenePulser Xcell™ (BioRad) a na 15 minut byly navraceny na led. Celý objem kyvety byl přenesen do 10ml zkumavky s kultivačním médiem. Po 24 hodinách bylo médium vyměněno a do zkumavek byla přidána selekční antibiotika o poloviční dávce (puromycin – finální koncentrace 27 µg/ml; G418 – finální koncentrace 0,3 mg/ml). Po 3-4 dnech bylo médium vyměněno a bylo přidáno již obvyklé množství antibiotik.

4.6 Encystace *G. intestinalis*

4.6.1 Uppsala encystační protokol

Dle Uppsala encystačního protokolu (Einarsson et al., 2016) byla do encystačního média před použitím přidána práškovou žluč (hovězí a ovčí žluč, Sigma; 5 mg/ml) a médium bylo přefiltrováno. Kultivační médium ve zkumavce s buňkami *G. intestinalis* bylo slito a zkumavka byla naplněna Uppsala encystačním médiem se žlučí. Buněčná kultura byla inkubována v 37 °C požadovanou dobu.

Za účelem pozorování živých buněk bylo připraveno 2x koncentrované Uppsala encystační médium, které bylo před použitím smícháno s 2% agarózou („Agarose, low gelling temperature“, Sigma) a destilovanou vodou v poměru 2:1:1.

Složení média:

Uppsala encystační médium	1x	2x
Finální objem	1 l	100ml
dH ₂ O	870 ml	doplněno do 100 ml
BBL™ Trypticase™ Pepton (BD)	20 g	4 g
Extrakt z kvasinek (Oxiod)	10 g	2 g
Glukóza (Sigma)	10 g	2 g
NaCl (Sigma)	2 g	0,4 g
K ₂ HPO ₄ (Lachema)	1 g	0,2 g
KH ₂ PO ₄ (Lachema)	0,6 g	0,12 g
L-cystein (Sigma)	2 g	0,4 g
Kyselina askorbová (Sigma)	0,2 g	0,04 g
Citrát železito-amnonný (Sigma)	0,0228 g	0,0046 g
10% inaktivované hovězí sérum (Gibco)	100 ml	20 ml
Penicilin-Streptomycin (Sigma)	15 ml	3 ml

Před přidáním hovězího séra je nutné upravit pH pomocí NaOH na PH 7,8. Hotové médium bylo sterilizováno filtrací (Filter Steritop 0,22 µm, Millipore). Médium se uchovává v -20 °C.

4.6.2 Dvou-krokový encystační protokol

Dle dvou-krokového encystačního protokolu (Jiráková et al., 2012) byly do média přidány těsně před použitím přefiltrované roztoky práškové žluči (finální koncentrace: 5 mg/ml; hovězí a ovčí žluč, Sigma) a laktátu (finální koncentrace: 0,546 mg/ml; Sigma). Z buněčné kultury *G. intestinalis* bylo slito kultivační médium a zkumavky byly naplněny encystačním médiem TYE:GS3, inkubovány byly 18 hodin ve 37 °C. Médium bylo slito a vyměněno za kultivační médium TYI-S-33. Buňky byly inkubovány dalších sedm hodin ve 37 °C.

Složení média:

TYE:GS3 encystační médium	1 l
dH ₂ O	825 ml
BBL™ Trypticase™ Pepton (BD)	20 g
Extrakt z kvasinek (Oxiod)	10 g
Glukóza (Sigma)	10 g
NaCl (Sigma)	2 g
K ₂ HPO ₄ (Lachema)	1,2 g
KH ₂ PO ₄ (Lachema)	0,6 g
L-cystein (Sigma)	2 g
Kyselina askorbová (Sigma)	0,2 g
10% inaktivované hovězí sérum (Gibco)	100 ml
Penicilin-Streptomycin (Sigma)	15 ml

Před přidáním hovězího séra je nutné upravit pH pomocí NaOH na PH 7,8. Hotové médium bylo sterilizováno filtrací (Filter Steritop 0,22 µm, Millipore). Médium se uchovává v -20 °C.

4.7 SDS-PAGE elektroforéza a western blot

4.7.1 Sklizení *G. intestinalis*

Ze zkumavky *G. intestinalis* byly skleněnou Pasteurovou pipetou odebrány mrtvé buňky a buňky byly dány na 15 minut na led. Po odebrání malého objemu buněk na novou pasáž, byly buňky přelity do 15ml falkony a stočeny na 10 minut při 1000 x g a 4 °C. Médium bylo odpipetováno a pelet resuspendován v 70 µl vzorkového pufru (1x koncentrovaný). Buňky byly denaturovány v bločku při teplotě 95 °C po dobu 5 minut.

4.7.2 SDS-PAGE elektroforéza

Vzorky byly analyzovány metodou SDS-PAGE elektroforézou na 10–12% akrylamidovém gelu. Jako standard pro zjištění relativní molekulové hmotnosti proteinů bylo použito 5 µl PageRuler™ (Thermo Scientific). Elektroforéza probíhala pod napětím 90–150 V.

4.7.3 Western blot

Proteiny z akrylamidového gelu byly přebíjeny na nitrocelulózovou membránu (Amersham) blotovacím přístrojem (Power Blot Cassette – Thermo Scientific/Biometra) dle doporučeného protokolu. Pro konstrukty SEC24-like-V5-HaloTag, β-giardin-HA-Y-FAST a Ndc80-HA-Y-FAST byla použita PVDF membrána (Amersham).

Nitrocelulózová (či PVDF) membrána byla vložena na 1 hodinu do blokovacího roztoku (5% roztok sušeného mléka se 15-20 µl/l TWEEN 20 - Sigma) na třepačku. Membrána byla inkubována v blokovacím roztoku s přidanou primární protilátkou a na 1 hodinu vložena na třepačku. Následně byla membrána 3 x 15 minut promývána blokovacím roztokem. Pak byla membrána inkubována v blokovacím roztoku s přidanou sekundární protilátkou konjugovanou s peroxidázou z křenu (HRP) a na jednu hodinu vložena na třepačku. Membrána byla 15 minut promývána v blokovacím roztoku a 2 x 15 minut v PBS. Nakonec byl k membráně přidán 1 ml substrátu pro HRP (Merck Luminata™ – Crescendo) a blot byl vyvolán přístrojem Amersham Imager 600.

Tabulka primárních protilátek:

Protilátka	Zvíře	Ředění	Producent
α-CWP1 A300	myš	2 µl/ml	Waterborne
α-HA	krysa	1 µl/ml	Roche
α-V5	myš	1 µl/ml	Sigma

Tabulka sekundárních protilátek:

Protilátka	Ředění	Producent
α -myš-HRP	0,5 μ l/ml	Sigma
α -krysa-HRP	0,5 μ l/ml	Sigma

4.8 Příprava preparátů a fluorescenční mikroskopie

4.8.1 Metanol-acetonová fixace

Kultura *G. intestinalis* byla zchlazena na ledu po dobu 15 minut, aby buňky přestaly adherovat ke stěně zkumavky. Z kultury byly odebrány 2 ml a 20 G injekční jehlou se stříkačkou byly vpraveny do anaerobní komůrky, tvořené z protilehlých stran podložními skly. Na 15 minut byla komůrka vložena do termostatu o teplotě 37 °C. Po přisednutí buněk na podložní skla byla komůrka rozmontována a preparáty byly ponechány, aby částečně zaschnuly. Preparáty byly fixovány pět minut v chlazeném metanolu (-20 °C) a permeabilizovány 5 minut v chlazeném acetonu (-20 °C).

Do připravené vlhké komůrky byly vloženy zaschnuté preparáty. Na každý preparát bylo naneseno 200 μ l blokovacího roztoku a preparáty byly blokovány jednu hodinu. Blokovací roztok byl slit a na preparáty bylo napipetováno po 300 μ l blokovacího roztoku s primární protilátkou (stejně protilátky jako byly použity na western blot). V tomto roztoku byly preparáty inkubovány jednu hodinu. Preparáty byly 3x promyty PBS pufrem vždy po 10 minutách. Následně byly preparáty inkubovány jednu hodinu v blokovacím roztoku se sekundárními protilátkami s minimalizovaným přístupem světla. Preparáty byly 3x promývány 10 minut PBS pufrem. Sklíčko bylo zakápnuto montovacím médiem VectaShield s DAPI (Vector Laboratories) a zakryto krycím sklíčkem, které bylo zafixováno lakem na nehty.

Pro fixaci cyst linie buněk s konstruktem CWP1-HaloTag bylo nejdříve nutné buňky inkubovat s TMR ligandem. Supernatant s cystami byl stočen 10 minut při 4 °C a 1000 x g. Médium bylo odsáto a pelet resuspendován v 0,5 ml TYI-S-33 média. Resuspendovaný pelet byl přenesen do 1,5ml zkumavky, kam byl přidán 1 μ l TMR substrátu pro HaloTag (Promega). Cysty byly inkubovány 30 minut ve 37 °C a následně stočeny 10 minut při pokojové teplotě a 1000 x g. Cysty byly dvakrát promyty 1 ml PBS. Po každém promytí byly buňky stočeny 10 minut při pokojové teplotě a 1000 x g. Pelet byl resuspendován v 0,3 ml PBS. 150 μ l bylo kápnuto na podložní sklíčko, které bylo pokryté polylysinem. Po zaschnutí byl preparát fixován pět minut v metanolu. Sklíčko bylo zakápnuto montovacím médiem VectaShield s DAPI (Vector Laboratories) a zakryto krycím sklíčkem, které bylo zafixováno lakem na nehty. Pro pozorování preparátů byl využit invertovaný fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse Ti-S s 100x objektivem.

Složení blokovacího roztoku:

0,25% BSA (Sigma)

0,25% želatina (Sigma)

0,05% TWEEN 20 (Sigma)

Rozpuštěno v PBS

Tabulka primárních protilátek:

Protilátka	Zvíře	Ředění	Producent
α -CWP1 A300	myš	2 μ l/ml	Waterborne
α -HA	krysa	1 μ l/ml	Roche
α -HA	králík	1 μ l/ml	Santa Cruz Biotechnology
α -V5	králík	1 μ l/ml	Sigma

4.8.2 Paraformaldehydová fixace

Encystované buňky obsahující konstrukt s HaloTag enzymatickým tagem byly zchlazeny 10 minut na ledu, přelity do 15 ml falkony a stočeny na 10 minut při 4 °C a 1000 x g. Médium bylo odsáto a buňky byly resuspendovány v 0,5 ml encystačního média a přepipetovány do 1,5 ml zkumavky. Byl přidán 1 μ l TMR substrátu pro HaloTag (Promega) a buňky byly inkubovány 30 minut v 37 °C. Buňky byly zchlazeny na ledu 10 minut a stočeny na 10 minut při 4 °C a 1000 x g. Médium s TMR substrátem bylo odsáto a buňky byly 2x promyty ve vychlazeném PBS. Po každém promytí bylo nutné buňky znovu stočit na 10 minut při 4 °C a 1000 x g.

Posléze byly buňky resuspendovány v 0,5 ml TYI-S-33 s 1% paraformaldehydem (EMS) a inkubovány 45 minut při 37 °C. Buňky, které nebyly barveny pomocí HaloTag enzymatického značení, byly fixovány přímo v kultuře. Fixované buňky byly stočeny na 5 minut při 1000 x g v pokojové teplotě a médium bylo odpipetováno. Buňky byly resuspendovány v 1 ml 1x PEM (Britton-Robinson buffer) pufru, stočeny na 1000 x g 5 minut v pokojové teplotě a pufr byl odsán. Buňky byly resuspendovány ve 400 μ l 1x PEM pufru. Byla připravena krycí sklíčka pokrytá polylysinem (Sigma) vsazená do 6 jamkové destičky. Na každé krycí sklíčko bylo kápnuto a rozetřeno 150 μ l suspenze buněk. Buňky byly ponechány 15 minut, aby se nalepily na krycí sklíčko a následně 3x promyty 1 ml 1x PEM pufru.

Pro barvení buněk protilátkami konjugovanými s fluorescenčními barvami bylo nutné buňky nejdříve 10 minut permeabilizovat 1 ml 0,1% Tritonu v 1x PEM pufru a 30 minut blokovat v 1 ml PEMBALG pufru. Dále byly buňky inkubovány jednu hodinu či přes noc v PEMBALG pufru s přidanou primární protilátkou (stejně primární protilátky jako byly použity při značení western blotu). Preparáty byly promyty 3x 5 minut 1x PEM pufrům a jednu hodinu inkubovány v PEMBALG pufru se sekundární protilátkou. Preparáty byly znovu 3x promyty v 1x PEM pufru. Na krycí sklíčko bylo kápnuto montovací médium VectaShield s DAPI (Vector Laboratories). Krycí sklíčko bylo přiklopeno na podložní sklíčko a fixováno lakem na nehty. Pro pozorování preparátů za využití wide-field mikroskopie byl využit invertovaný fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse Ti-S s objektivem 100x či invertovaný fluorescenční mikroskop Nikon Ti-E s objektivem 60x u preparátů, kde bylo snímáno více vrstev buňky. Pro pozorování preparátů konfokální mikroskopií byl použit invertovaný mikroskop Leica TSC SP8 s olejovým objektivem 60x.

Tabulka sekundárních protilátek:

Protilátka	Ředění	Producent
α -myš-Alexa 488	0,5 μ l/ml	Invitrogen
α -králík-Alexa 488	0,5 μ l/ml	Invitrogen
α -králík-Alexa 594	0,5 μ l/ml	Invitrogen

Složení pufrů:

1×PEM pufr:

30,2 g PIPES (200 mM)

2 ml z 0,5M roztoku EGTA (2mM)

100 μ l z 1M roztoku MgSO₄ (0,2mM)

pH 6,9

do 1 l dH₂O

Roztok je třeba sterilizovat v autoklávu.

PEMBALG:

50 ml 2×PEM pufru

1 g BSA (1%)

1,8 g lysinu (100 mM)

0,5 g želatiny (0,5%), (Sigma)

do 100 ml dH₂O

4.8.3 Live-imaging

4.8.3.1 Příprava buněk

Pro pozorování buněk pomocí wide-field mikroskopie za využití invertovaného fluorescenčního mikroskopu Nikon Ti-E, byly buňky kultivovány jeden den v 96 jamkové destičce (In Vitro Scientific) za anaerobních podmínek v uzavřeném pytlíku za využití systému AnaeroGenTM Compact (Thermo Scientific) pro generování anaerobních podmínek v inkubátoru při 37 °C, aby vytvořily přibližně 80% konfluenci. Následně bylo kultivační médium vyměněno za encystační médium a buňky byly encystovány za anaerobních podmínek při 37 °C požadovanou dobu.

Pro pozorování pomocí konfokální mikroskopie prostřednictvím invertovaného fluorescenčního mikroskopu Leica TSC SP8 byl pro kultivaci místo 96 jamkové destičky použita 8 jamková komůrka (Cellvis).

4.8.3.2 HaloTag značení

Buňky v mikroskopovací destičce byly zality nahřátým encystačním médiem (37 °C) s přidáním TMR substrátem (Promega; 0,5 μ l/ml) a inkubovány 30 minut v termostatu při 37 °C. Je zapotřebí

promývat teplým (37 °C) PBS pufrem, dokud není tekutina čirá. Následně byly buňky mikroskopovány v PBS.

4.8.3.3 Y-FAST značení

Buňky v mikroskopovací destičce či komůrce byly zality encystačním médiem či PBS (37 °C) s přidáním HMBR substrátem (1:10000) (HMBR substrát nám poskytl Arnaud Gautier, Ph.D. z PSL Univerzity v Paříži, Francii) a ve specifikovaných případech s glukózou (1 g/ml; Sigma).

4.8.4 Fluorescenční mikroskopie

4.8.4.1 Nikon Ti-E

Buňky byly sledovány použitím vodního 60x objektivu v 96 jamkové destičce v inkubační komůrce při 37 °C. Výsledné snímky byly zpracovány v programu Fiji (ImageJ).

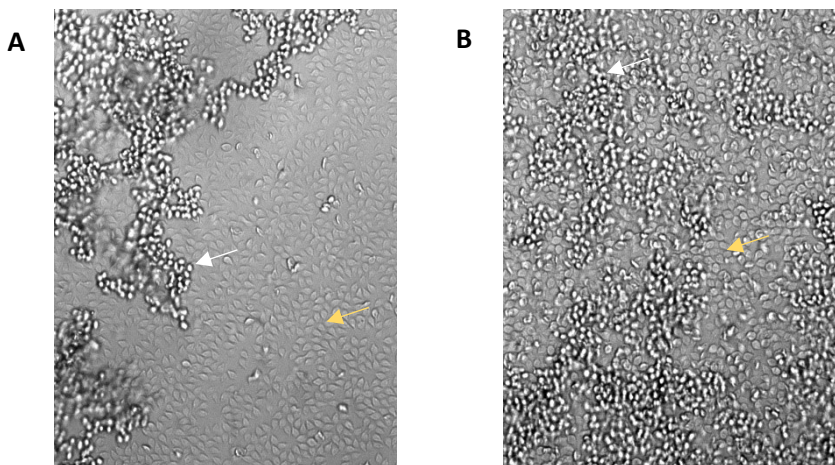
4.8.4.2 Leica TSC SP8

Buňky byly sledovány použitím vodního 60x objektivu v 8 jamkové komůrce v inkubační komůrce při 37 °C a 1% obsahem atmosférického kyslíku a 99% obsahem dusíku. Transformované buňky sledované konfokální mikroskopií. Pro sledování netransformovaného kmene WB byla využita wide-field mikroskopie. Výsledné snímky byly zpracovány v programech LasX a Fiji (ImageJ).

5 Výsledky

5.1 Encystace *G. intestinalis* in vitro

Pro indukci encystace existuje řada protokolů. V naší laboratoři jsou využívány dva, dvou-krokový encystační protokol (Jiráková et al., 2012) a tzv. Uppsala encystační protokol (Einarsson et al., 2016). Provedli jsme srovnání těchto protokolů, abychom zjistili, který je pro naše účely vhodnější. Dvou-krokový protokol vyžaduje inkubaci v encystačním médiu po dobu 18 hodin, po kterých je médium vyměněno za klasické kultivační médium. Uppsala encystační protokol využívá pro indukci encystace pouze jediné encystační médium. Po encystaci buněk kmene WB (ATCC 30957) za použití obou protokolů bylo patrné, že za stejně dlouhou dobu indukování encystace je možné získat větší množství cyst použitím Uppsala encystačního protokolu (Obr. 14). Pro svoji jednoduchost, která umožňuje dlouhodobé pozorování buněk bez potřeby výměny média, a větší výtěžek indukce encystace byl pro všechny následující experimenty vybrán Uppsala encystační protokol.

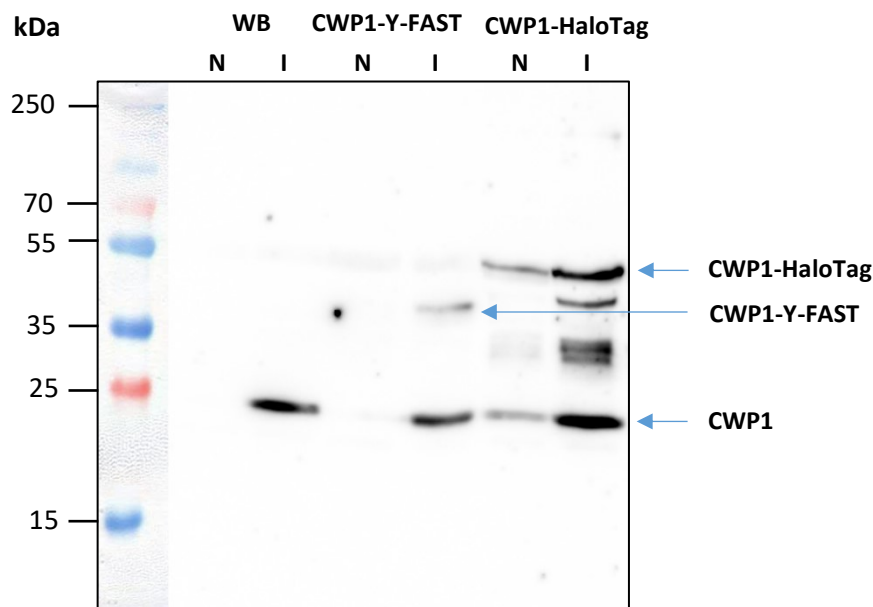


Obrázek 14: Srovnání dvou protokolů, které indukují encystaci. Na obrázcích lze vidět encystující trofozoity (žluté šipky; kmen WB ATCC 30957), kteří adherují k podložnímu sklu. V médiu nad nimi plavou zakulacené cysty (bílé šipky). A) Encystující buňky po indukci dvou-krokovým encystačním protokolem. Po 18 hodinách indukce encystace v encystačním médiu TYE-GS3 bylo médium vyměněno za kultivační médium TYI-S-33, ve kterých buňky encystovaly dalších sedm hodin. B) Encystující buňky po indukci Uppsala encystačním protokolem. Pozorovány byly buňky po 25 hodinách v Uppsala encystačním médiu. Patrné bylo větší množství cyst nežli za použití dvou-krokového protokolu. Snímky byly pořízeny pod průchozím světlem. Zvětšení: 100x.

5.2 Expresе konstruktů proteinů fúzovaných s enzymatickými tagy v *G. intestinalis*

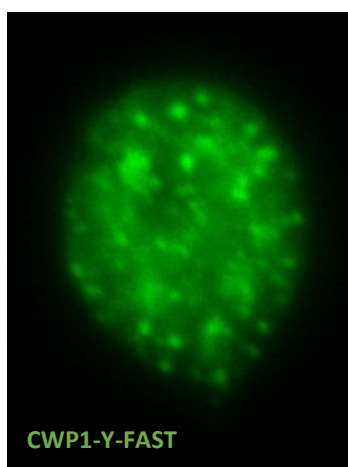
5.2.1 CWP1-Y-FAST-pTG

Po úspěšném vložení genu pro CWP1 protein s jeho přirozenou promotorovou oblastí do pTG plazmidu, byl do výsledného plazmidu vložen i gen pro Y-FAST. Po ověření správnosti sekvence vytvořeného konstruktu, byl vektorem transformován kmen WB (ATCC 30957). Úspěšnost transformace byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy a western blotu. V transformovaných buňkách *G. intestinalis* byla potvrzena exprese fúzního proteinu CWP1-Y-FAST (Obr. 15).



Obrázek 15: Ověření exprese konstruktů CWP1-Y-FAST-pTG a CWP1-HaloTag-pTG v *G. intestinalis* pomocí SDS-PAGE elektroforézy a western blotu. Pro detekci CWP1 byla použita primární protilátka α -CWP1 a sekundární protilátka α -myš-HRP. Jako negativní kontrola byl použit netransformovaný kmen WB. Porovnávána byla exprese v neencystujících trofozoitech (N) a exprese proteinu po 5 hodinách indukce v Uppsala encystačním médiu (I). Ve všech konstruktech je po indukci viditelná exprese přirozeně se vyskytující formy CWP1 (26 kDa). Po indukci encystace v buňkách obsahující konstrukt CWP1-Y-FAST-pTG je viditelná exprese fúzního proteinu o predikované velikosti 39.9 kDa. V buňkách obsahující konstrukt CWP1-HaloTag-pTG je viditelná slabší exprese obou forem CWP1 proteinu i v neindukovaných buňkách. Po indukci je viditelná vyšší exprese konstruktu i přirozená forma CWP1. Band odpovídající fúznímu proteinu CWP1-HaloTag (cca 55 kDa) má menší molekulovou hmotnost, než bylo predikováno (59.5 kDa). Bandy v rozmezí 30–50 kDa považujeme za degradační produkty fúzního proteinu CWP1-HaloTag.

Lokalizace fúzního proteinu v encystujících buňkách byla ověřena *in vivo* přidáním fluorescenčního substrátu HMBR k živým buňkám. Lokalizace CWP1-Y-FAST morfologicky odpovídá ESV váčkům. Tímto způsobem jsme také ověřili funkčnost enzymatického tagu Y-FAST v transformovaných buňkách (Obr. 16).

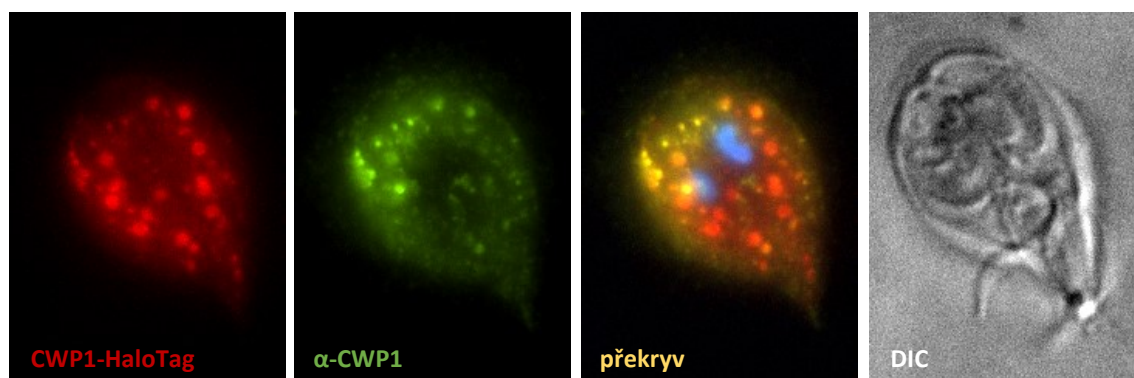


Obrázek 16: Lokalizace chimerického proteinu CWP1-Y-FAST v živých buňkách prostřednictvím enzymatického značení. Distribuce tohoto proteinu morfologicky odpovídá ESV váčkům. Před pozorováním byly buňky encystovány 17 hodin v Uppsala encystačním médiu.

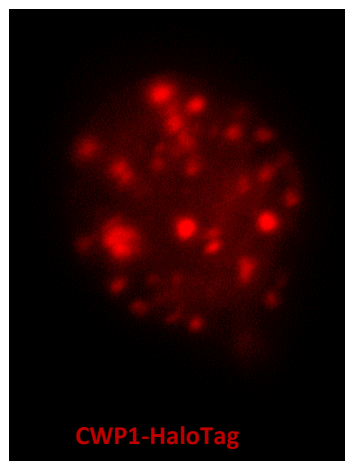
5.2.2 CWP1-HaloTag-pTG

Do pTG vektoru, který již obsahoval gen pro CWP1 protein, byl také vložen gen pro enzymatický tag HaloTag. Výsledným vektorem CWP1-HaloTag-pTG byl transformován kmen WB (ATCC 30957). Exprese konstruktu v transformovaných buňkách byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy a western blotu. Chimerický protein CWP1-HaloTag byl v encystujících buňkách exprimován. Jeho exprese byla ovšem detekována i v populaci trofozoitů, kteří nebyli indukováni encystačním médiem. Protein se tedy mohl samovolně exprimovat i v neencystujících buňkách či mohlo dojít k spontánní encystaci části transformované populace (Obr. 15).

Lokalizace byla ověřena pomocí enzymatického značení v živých buňkách a posléze nepřímé imunofluorescence na fixovaných preparátech. Chimerický protein CWP1-HaloTag kolokalizoval s CWP1 proteinem značeným protilátkou (Obr. 17). Následně byla prokázána funkčnost enzymatického značení pomocí HaloTagu *in vivo* (Obr. 18).



Obrázek 17: Kolokalizace CWP1-HaloTag proteinu s endogenním CWP1 v encystujících trofozoitech *G. intestinalis* prostřednictvím enzymatického značení a nepřímé imunofluorescence. Toto zobrazení je výsledkem projekce maximální intenzity přibližně 20 vrstev jedné buňky. Červeně je značen CWP1-HaloTag pomocí enzymatického tagu po přidání TMR ligandu. Zeleně je značen protein CWP1 pomocí primární protilátky α -CWP1 a sekundární protilátky konjugované s Alexou 488. Překryv znázorňuje kolokalizaci obou forem CWP1 pomocí obou metod. Modře jsou znázorněna jádra prostřednictvím DAPI. Trofozoit ve viditelném spektru je znázorněn pomocí diferenciální interferenčního kontrastu (DIC). Trofozoiti byli zafixováni po 13 hodinách encystace. Buňky byly fixovány paraformaldehydovou fixací. Snímek byl pořízen pomocí wide-field mikroskopu.



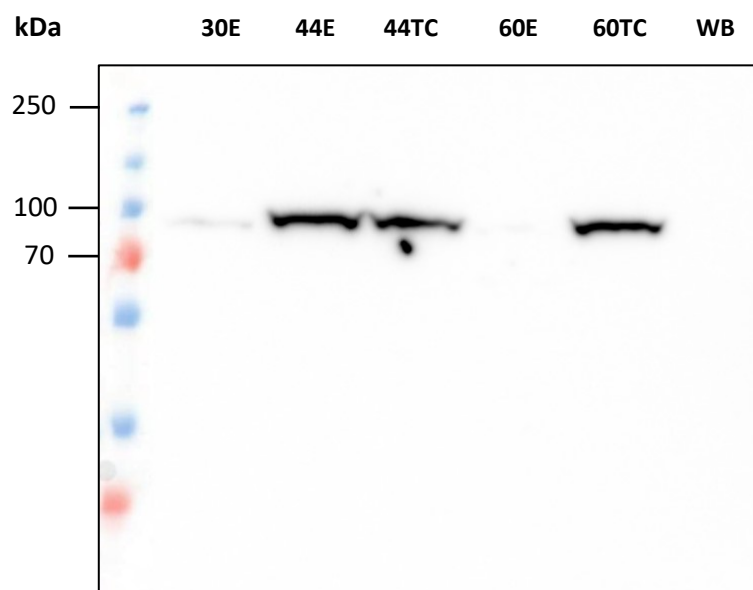
Obrázek 18: Lokalizace chimerického proteinu CWP1-HaloTag prostřednictvím enzymatického značení v živých trofozoitech *G. intestinalis*. Červené značení bylo docíleno přidáním TMR ligandu. Tento protein je lokalizován ve strukturám, které odpovídají ESV váčkům. Před pozorováním byly buňky encystovány 17 hodin v Uppsala encystačním médiu.

5.2.3 CenH3-HA-Y-FAST-pTG

Kromě zobrazení vlastních ESV váčků jsme vytvořili i několik dalších konstruktů, které by nám umožnili identifikovat a sledovat encystaci *in vivo*. Jedním z procesů probíhající v průběhu encystace je jaderné dělení (mitóza). Pro zobrazení chromozomů v jaderném kompartmentu byl vybrán giardiový homolog centromerického histonu 3 (CenH3; ID genu na GiardiaDB: GL50803_20037; také nazýván CENP-A) po konzultaci s RNDr. Pavlou Tůmovou Ph.D. Nejprve byl do pTG vektoru vložen gen pro Y-FAST, který rovněž obsahoval HA tag. Přidání HA tagu bylo nutné pro možnost detekce pomocí western blotu a imunofluorescence, jelikož naše laboratoř nedisponuje protilátkou, která by byla specifická pro CenH3. Do tohoto plazmidu byl následně úspěšně vložen i gen pro CenH3. Výsledným vektorem byly transformovány buňky kmene WB C6. Expresi proteinu v transformovaných buňkách pomocí western blotu a nepřímé imunofluorescence se ovšem nepodařilo ověřit.

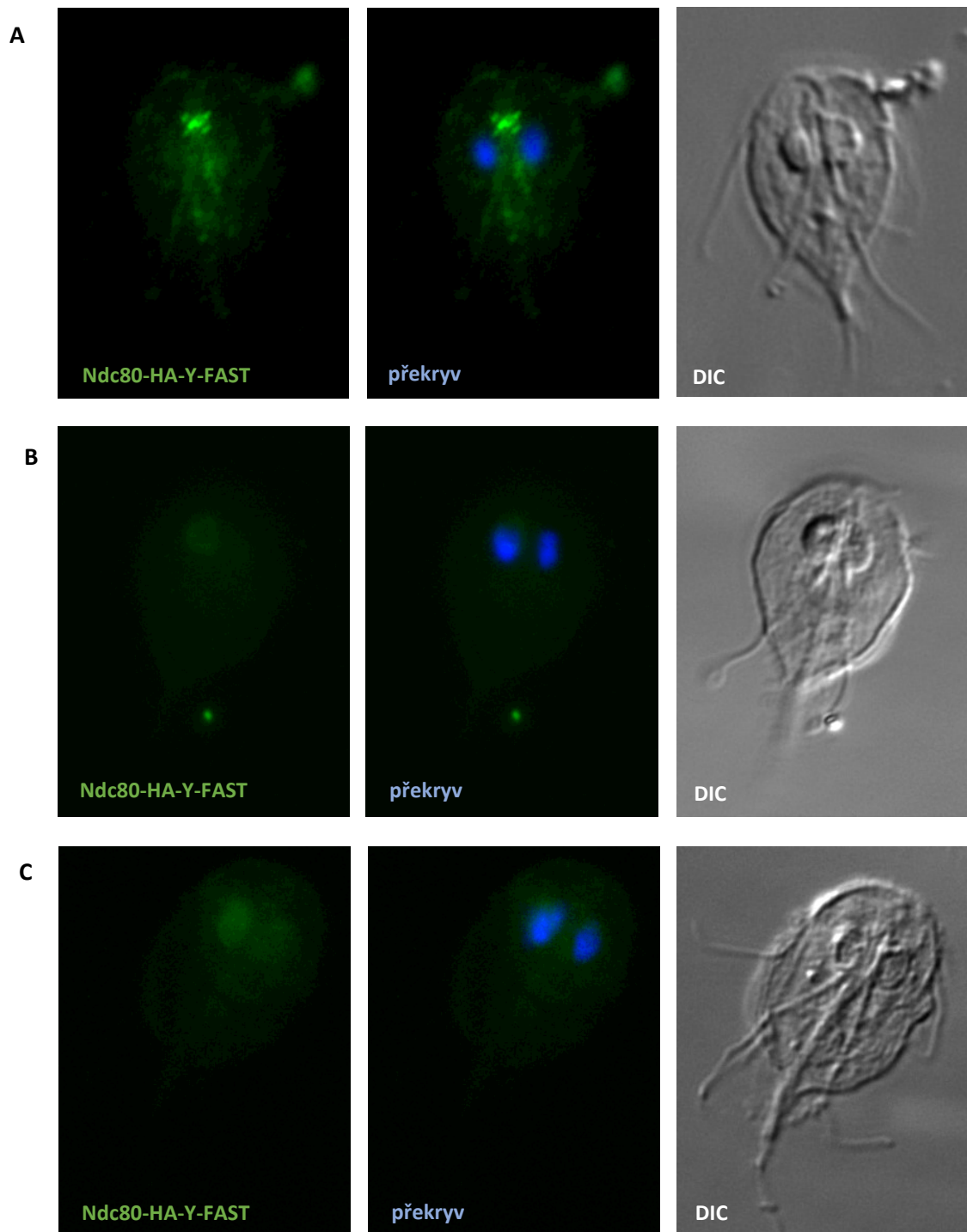
5.2.4 Ndc80-HA-Y-FAST-pTG

Dalším vybraným proteinem po konzultaci s RNDr. Pavlou Tůmovou Ph.D. byl kandidát giardiového homologu kinetochorového proteinu Ndc80 (ID genu na GiardiaDB: GL50803_32786). Gen pro Ndc80 byl vložen do plazmidu, který již obsahoval fúzi HA tagu a proteinu Y-FAST. Po úspěšné transformaci buněk kmene WB C6 byla ověřena jeho exprese pomocí SDS-PAGE elektroforézy a western blotu. Predikovaná molekulová hmotnost chimerického proteinu Ndc80-HA-Y-FAST je 82,5 kDa. Jednotlivé vytvořené kmeny (pojmenované podle podmínek transfekce) exprimovaly různé hladiny proteinu. Zatímco kmeny 44E, 44TC a 60TC exprimovaly dobře detekovatelné množství proteinu o správné velikosti, kmen 30E obsahoval výrazně nižší množství a kmen 60E byl zcela negativní, tak jako kontrolní vzorek WB C6 (Obr. 19). K tomu, že vyselektované buňky *G. intestinalis* neexprimují gen, který je přítomný na vloženém plazmidu, občas dochází. Zdůrazňuje to potřebu testování přítomnosti exprese daného proteinu.

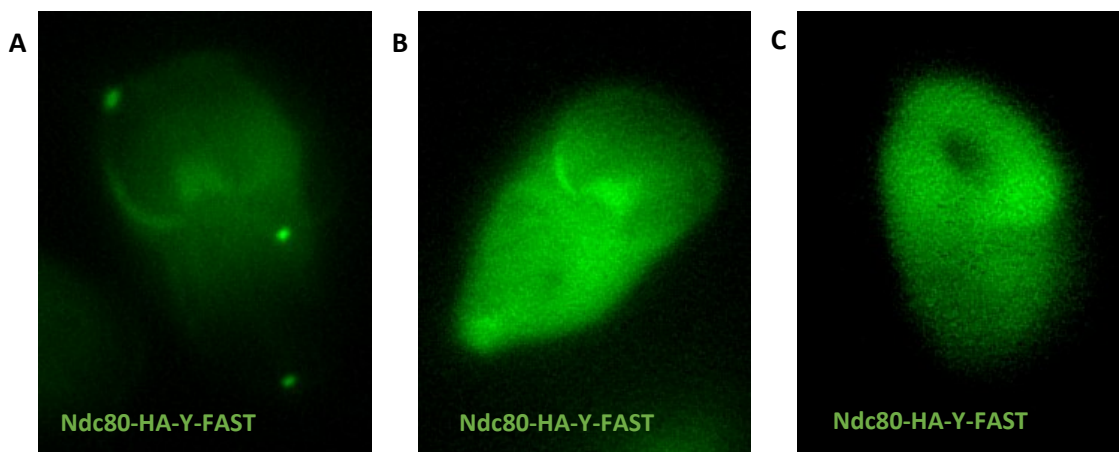


Obrázek 19: Ověření exprese konstruktů Ndc80-HA-Y-FAST-pTG v *G. intestinalis* pomocí SDS-PAGE elektroforézy a western blotu. Pro detekci HA tagu byla použita primární protilátka α -HA (krysa) a sekundární protilátka α -krysa-HRP. Jako negativní kontrola byl použit netransformovaný kmen WB C6. V buněčných liniích 30E, 44E, 44TC a 60TC je viditelná exprese chimerického proteinu Ndc80-HA-Y-FAST o predikované velikosti 82,5 kDa. Exprese v kmenu 30E byla nižší v porovnání s ostatními pozitivními liniemi. Exprese v kmenu 60E a v netransformovaném kmenu WB C6 byla negativní.

Následně byla ověřena lokalizace Ndc80-HA-Y-FAST pomocí metody nepřímé imunofluorescence. V transformovaných buňkách byla často pozorována asociace chimerického proteinu Ndc80-HA-Y-FAST s cytoskeletálními útvary (Obr. 20A). V některých buňkách byl pozorován i slabý signál v jádrech (Obr. 20B a 20C) a to i v kmenu 60E, ve kterém nebyla exprese pomocí western blotu detekována (Obr. 20C). Je možné, že hladiny exprese chimerického proteinu v této linii byly příliš nízké, aby byly detekovatelné pomocí western blotu za námi zvolených podmínek. Lokalizace chimerického proteinu v transformovaných buňkách byla také ověřena metodou enzymatického značení v živých buňkách. Ve všech pozorovaných buňkách byl detekován signál v cytoplasmě. Lokalizace v jádrech pozorována nebyla (Obr. 21). Je možné, že se před pozorováním živých buněk v kultuře vyselektovaly linie, které se adaptovaly na přítomnost chimerického proteinu jeho úplnou relokací do cytoplasmy. Přítomnost chimerického proteinu v jádrech mohla snižovat jejich životaschopnost. U kmenu 44E a 44TC byla také pozorována asociace Ndc80-HA-Y-FAST s cytoskeletálními útvary (Obr. 21A a 21B). V kmenu 60E byl signál pozorován pouze v cytoplasmě (Obr. 21C).



Obrázek 20: Lokalizace Ndc80-HA-Y-FAST proteinu v *G. intestinalis* prostřednictvím metody nepřímé imunofluorescence Zeleně je značen chimerický protein pomocí primární protilátky α -HA a sekundární protilátky konjugované s Alexou 488. Modře je znázorněna jaderná DNA barvená DAPI. Překryv znázorňuje kolokalizaci chimerického proteinu Ndc80-HA-Y-FAST a jader. DIC snímek zobrazuje odpovídajícího trofozoita ve viditelném světle. A) kmen 44E - protein se nachází v oblastech cytoskeletálních struktur v buňce, které by mohly odpovídat axonemám bičíků a jejich bazálním tělískům. B) kmen 44TC - protein slabě lokalizuje v jednom z jader a v cytoplasmě. C) kmen 60E - protein se nachází v jádrech a v cytoplasmě. Buňky byly fixovány metanol-acetonovou fixací. Snímek byl pořízen pomocí wide-field mikroskopu.

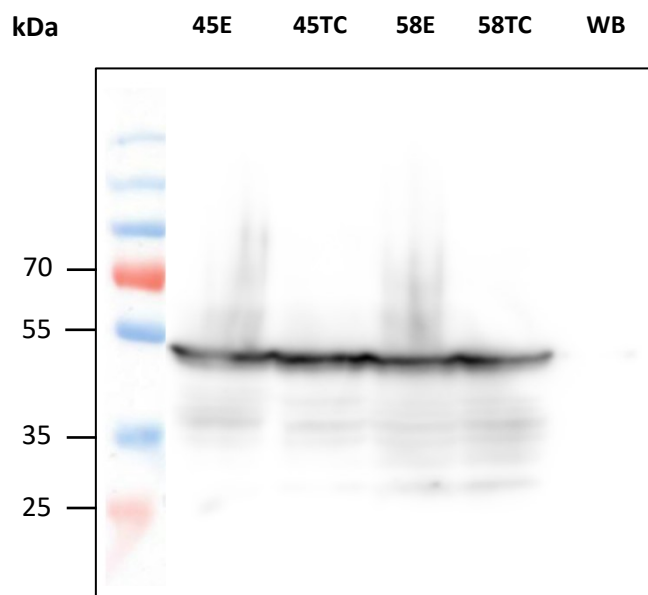


Obrázek 21: Lokalizace chimerického proteinu Ndc80-HA-Y-FAST (zeleně) prostřednictvím enzymatického značení v živých buňkách. Ve všech pozorovaných buňkách byl detekován signál v cytoplasmě. A) Kmen 44E - protein byl kromě cytoplasmy také lokalizován v okrajových oblastech přísavného disku. B) Kmen 44TC - byla pozorována stejná lokalizace jako u kmene 44E, signál v cytoplasmě byl ovšem silnější. C) Kmen 60E - signál byl pozorován pouze v cytoplasmě.

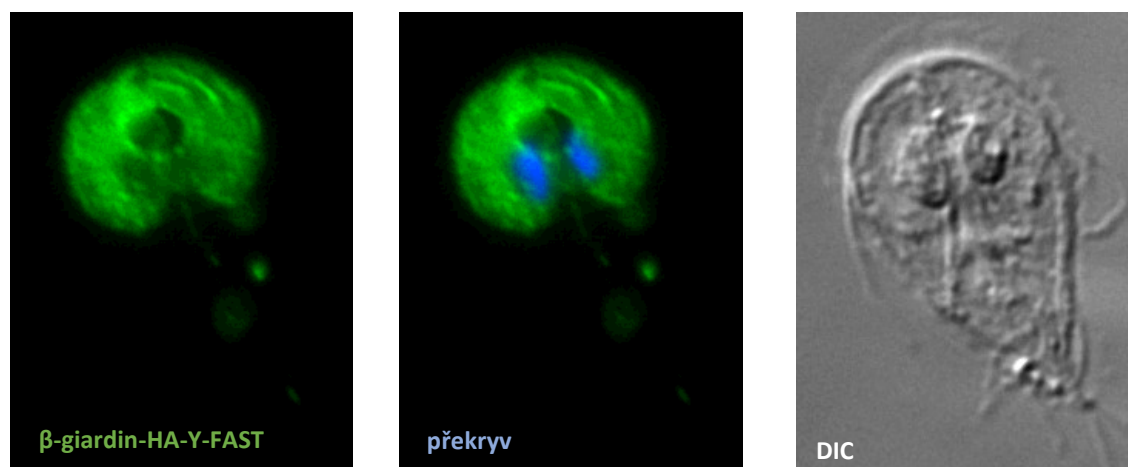
5.2.5 B-giardin-HA-Y-FAST-pTG

Během encystaci dochází k postupnému rozvolňování a depolymeraci přísavného disku. Pro vizualizaci adhezivního disku v průběhu encystace byl vybrán protein β -giardin, který asociuje s cytoskeletálními strukturami disku (Crossley and Holberton, 1983). Gen pro β -giardin byl vložen do plazmidu, který již obsahoval HA-tagovanou verzi Y-FAST proteinu. Výsledný vektor byl transformován do trofozoitů kmene WB C6. Exprese proteinu byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy a western blotu. Všechny transformované kmeny byly pozitivní na expresi chimerického proteinu β -giardin-HA-Y-FAST. Netransformované buňky WB C6, které jsme zde posloužili jako negativní kontrolu, byly negativní na expresi chimerického proteinu. Relativní molekulová hmotnost exprimovaného proteinu byla o něco větší než predikovaná velikost 45,8 kDa (Obr. 22).

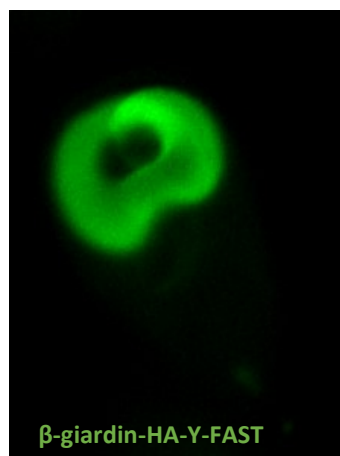
Lokalizace chimerického proteinu byla zjišťována metodou nepřímé imunofluorescence. Lokalizace proteinu β -giardin-HA-Y-FAST odpovídá adhezivnímu disku. Protein byl také pozorován v dalších cytoskeletálních útvarech (Obr. 23). Funkčnost enzymatického tagu byla ověřena v živých buňkách transformovaných linií. I zde byla pozorována lokalizace v adhezivním disku (Obr. 24).



Obrázek 22: Ověření exprese chimerického proteinu β -giardin-HA-Y-FAST pomocí western blotu. Protein, o predikované velikosti 45,8 kDa, byl detekován primární protilátkou proti HA tagu (krysa) a sekundární protilátkou konjugovanou s HRP. Všechny transformované linie buněk, které jsme pojmenovali 45E, 45TC, 58E a 58TC, byly pozitivní na expresi chimerického proteinu β -giardin-HA-Y-FAST. Ve všech exprimujících liniích byly také detekovány bandy menších velikostí, které považujeme za degradační produkty chimerického proteinu. Jako negativní kontrola sloužila ne-transformovaná linie kmene WB C6. Exprese proteinu nebyla v negativní kontrole detekována.



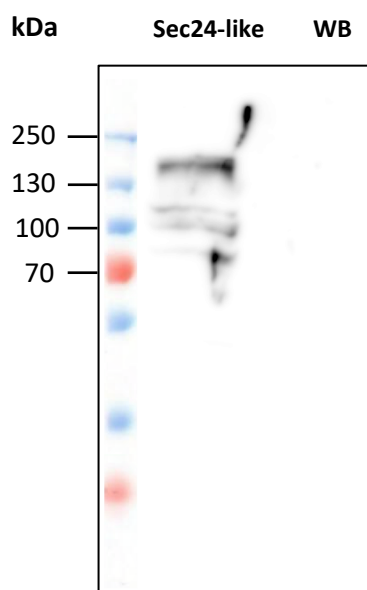
Obrázek 23: Lokalizace chimerického proteinu β -giardin-HA-Y-FAST pomocí metody nepřímé imunofluorescence. Protein byl detekován pomocí primární protilátky specifické pro HA tag (krysa) a sekundární protilátky konjugované s Alexa 488 (zeleně). DNA v jádrech v překryvu je obarvena pomocí DAPI (modře). Lokalizace proteinu odpovídá adhezivnímu disku *G. intestinalis*. Signál byl také detekován v dalších cytoskeletálních útvarech. DIC zobrazuje odpovídající buňku ve viditelném světle. Buňky byly fixovány metanol-acetonovou fixací. Snímek byl pořízen pomocí wide-field mikroskopu.



Obrázek 24: Lokalizace chimerického proteinu β -giardin-Y-FAST v živých buňkách prostřednictvím enzymatického značení pomocí tagu Y-FAST. Lokalizace tohoto proteinu odpovídá adhezivnímu disku.

5.2.6 SEC24-like-V5-HaloTag-pUC57-mini

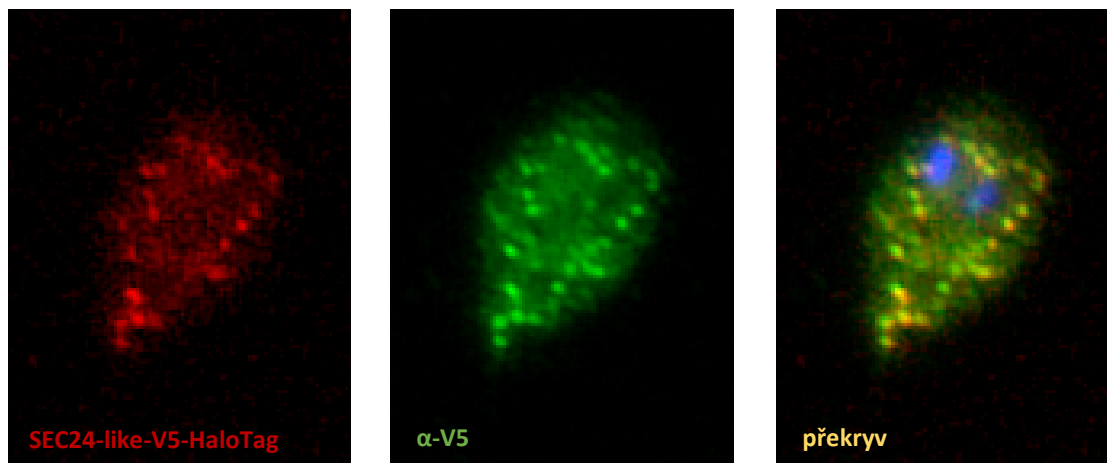
Pro vizualizaci ERES a biogeneze ESV váčků byl vybrán protein SEC24-like (ID genu na GiardiaDB: GL50803_16520). Do plazmidu pUC57-mini byl nejprve vložen enzymatický tag HaloTag označený na N-konci V5 tagem, který byl přidán pro možnost detekce pomocí western blotu. Následně byl do vektoru vložen i gen pro SEC24-like. Výsledným plazmidem byly transformovány buňky, které již obsahovaly plazmid CWP1-Y-FAST-pTG. Expres v transformovaných buňkách byla ověřena prostřednictvím SDS-PAGE elektroforézy a western blotu. Predikovaná velikost chimerického proteinu je 161 kDa. Transformované buňky exprimovaly protein odpovídající velikosti. Bandy o menší velikosti byly považovány za degradační produkty exprimovaného proteinu.



Obrázek 25: Ověření exprese chimerického proteinu SEC24-like-V5-HaloTag pomocí SDS-PAGE elektroforézy a western blotu. Pro detekci exprese proteinu byla použita primární protilátka proti V5 tagu a sekundární protilátka konjugovaná s HRP. V transformované linii byl detekován protein odpovídající velikosti (161 kDa) a bandy o menších velikostech, které by mohly odpovídat degradačním produktům chimerického proteinu. Jako negativní kontrola byla použita linie netransformovaných buněk WB C6, ve které nebyl detekován chimerický protein.

Expres chimerického proteinu v netransformovaných buňkách WB C6 detekována nebyla (Obr.25).

Lokalizace chimerického proteinu SEC24-like-V5-HaloTag byla ověřena kombinací enzymatického značení TMR ligandem HaloTagu a nepřímé imunofluorescence. Tímto způsobem jsme zároveň ověřili funkčnost enzymatického tagu HaloTag v tomto konstruktu (Obr. 26). Lokalizace chimerického proteinu SEC24-like-V5-HaloTag odpovídala morfologicky strukturám ERES (Obr. 6). Vizualizace HaloTagu v transformovaných buňkách *in vivo* se nepodařila.

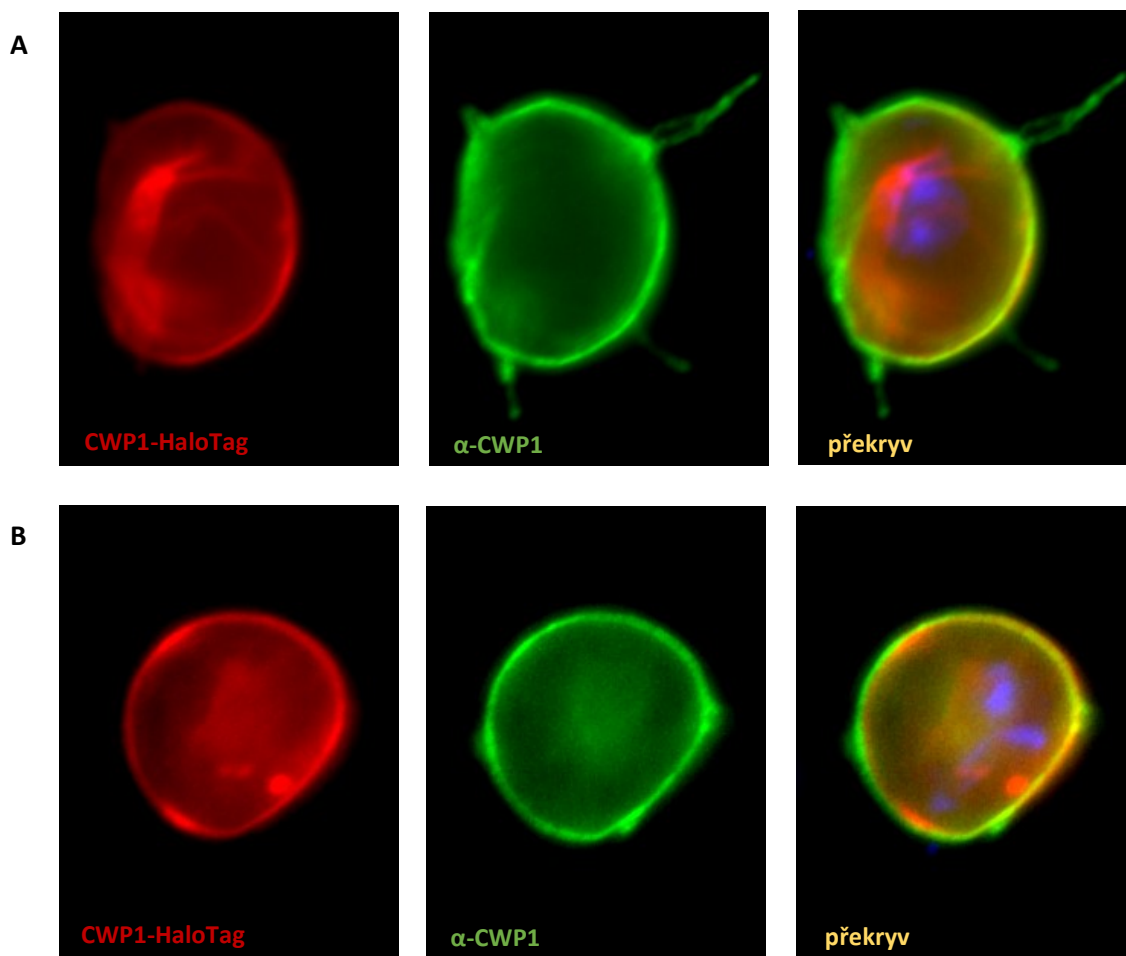


Obrázek 26: Lokalizace chimerického proteinu SEC24-like-V5-HaloTag prostřednictvím kombinace metod nepřímé imunofluorescence a enzymatického značení HaloTagem. Lokalizace chimerického proteinu morfologicky odpovídá strukturám ERES. Červeně je značen tento protein pomocí enzymatického značení. Zeleně je značen SEC24-like-V5-HaloTag pomocí metody nepřímé imunofluorescence použitím primární protilátky specifické pro V5 tag a sekundární protilátky konjugované s Alexou 488. Modře je na překryvu znázorněna DNA v jádrech barvením DAPI. Buňky byly fixovány metanol-acetonovou fixací. Snímek byl pořízen pomocí wide-field mikroskopu.

5.3 Vliv exprese chimerických proteinů na průběh encystace

5.3.1 CWP1-HaloTag

Abychom se ujistili, že přidání enzymatického tagu na C-konec CWP1 proteinu nenarušuje průběh encystace a finální vytvoření cysty, indukovali jsme encystaci transformovaných trofozoitů po dobu 25 hodin. Tato doba se jevila jako dostatečná pro tvorbu cyst v netransformovaných buňkách WB (ATCC 30957) (viz sekce 5.1) (Obr. 14). Použitím kombinací metod nepřímé imunofluorescence a enzymatického značení jsme byli schopni detekovat cysty v různých stádiích zrání, které na svém povrchu nesly CWP1 protein (Obr. 27). Pozorované cysty byly ovšem netypického kulovitého tvaru (Obr. 27B).

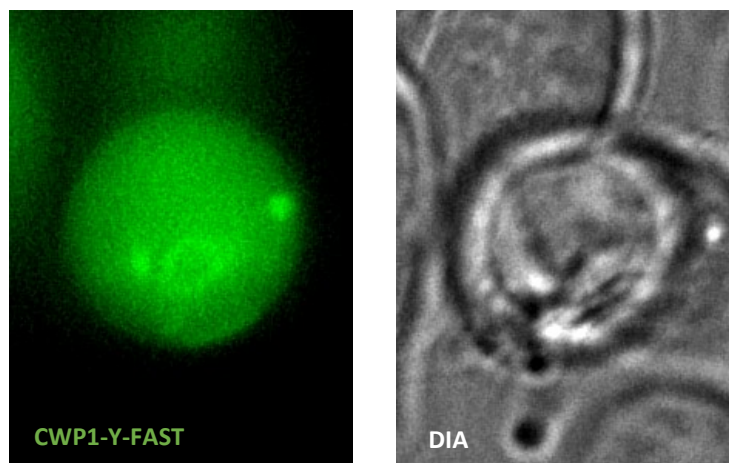


Obrázek 27: Tvorba cyst v linii buněk, které byly transformovány konstruktem CWP1-HaloTag-pTG. Zobrazení je výsledkem kombinace metod enzymatického značení pomocí HaloTagu a nepřímé imunofluorescence. Červeně je značen CWP1-HaloTag pomocí enzymatického tagu HaloTag. Zeleně je značen protein CWP1 pomocí primární protilátky α -CWP1 a sekundární protilátky konjugované s Alexou 488. Překryv znázorňuje lokalizaci CWP1 pomocí obou metod. Modře je znázorněna DNA barvená DAPI. Buňky byly fixovány metanolem, bez permeabilizace acetonem. A) Nezralá cysty se sekretovaným CWP1 proteinem na povrchu. Stále jsou zde viditelné bičíky, které zatím nebyly zcela internalizovány. B) Cysta kulovitého tvaru. V cystě jsou patrná mitotická jádra. Snímek byl pořízen pomocí wide-field mikroskopu.

5.3.2 CWP1-Y-FAST

Vliv na průběh encystace byl sledován i u linie buněk, která obsahovala konstrukt CWP1-Y-FAST-pTG. Buňky byly encystovány 27 hodin a následně bylo médium vyměněno za PBS, ve kterém encystace mohla pokračovat dalších šest hodin před pozorováním buněk *in vivo* pomocí wide-field mikroskopie. Pozorovali jsme cysty, které měly na svém povrchu sekretovaný CWP1-Y-FAST. I tyto cysty byly netypického kulovitého tvaru (Obr. 28).

Přestože vznikaly cysty neobvyklého tvaru, což bylo pravděpodobně způsobeno přítomností chimerického proteinu, podařilo se nám prokázat, že tyto buňky jsou schopné sekrece CWP1 proteinu a jeho zabudování do stěny cysty. Rozhodli jsme se tedy pro využití vytvořených konstruktů k pozorování živých buněk.

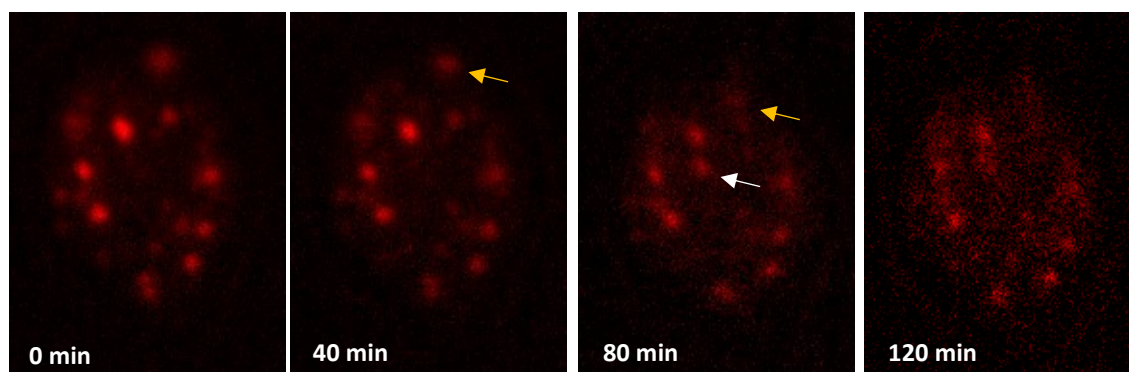


Obrázek 28: Cysty transformovaných linií detekovány pomocí metody enzymatického značení prostřednictvím tagu Y-FAST *in vivo*. Zeleně je značen chimerický protein CWP1-Y-FAST. Kromě sekretovaného proteinu CWP1-Y-FAST jsou v cystě viditelné i struktury, které by mohly odpovídat ESV váčkům. DIA zobrazuje odpovídající cystu pod průchozím světlem.

5.4 Live imaging prostřednictvím enzymatického značení

5.4.1 CWP1-HaloTag

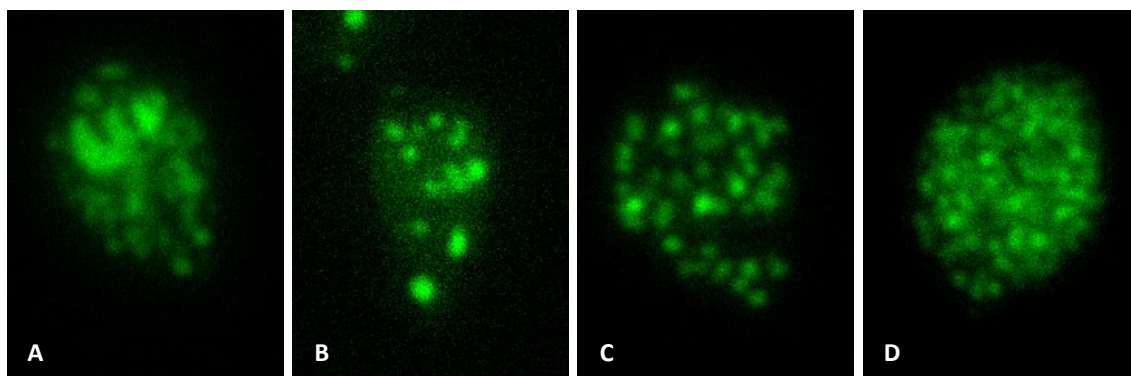
V počátečních experimentech byl pro pozorování encystace vybrán wide-field mikroskop Nikon Ti-E, který je vybaven komůrkou umožňující pozorování živých buněk při 37 °C a vyhříváním objektivu. Wide-field mikroskopie ovšem neumožňuje sledování buněk v encystačním médiu, které obsahuje složky s vysokou autofluorescencí. Proto bylo nutné před pozorováním vyměnit encystační médium za PBS. Buňky byly před pozorováním encystovány 17 hodin. Po inkubaci s TMR ligandem byl snímek pořízen každou minutu po dobu dvou hodin. Během této doby došlo k značnému poklesu fluorescence. Po dobu pozorování zůstala většina ESV váčků nehybná. Během pozorování se objevil pouze jeden nový ESV váček (bílá šipka). Z pozorování ovšem nebylo jasné, zda šlo o tvorbu nového váčku či jestli pouze došlo k jeho posunu v rámci buňky (Obr. 29, Příloha 1). Během pozorování nebylo patrné žádné poškození buněk vlivem světla či vystavení TMR ligandu.



Obrázek 29: Pozorování ESV váčků v buňkách obsahujících konstrukt CWP1-HaloTag *in vivo* využitím metody enzymatického značení HaloTagem. Buňky byly pozorovány po dobu dvou hodin v PBS po 17 hodinách indukce encystace. Snímek byl pořízen každou minutu. Červeně je značen protein CWP1-HaloTag. Většina ESV váčků se během pozorování jevila nehybná. Bylo možné pozorovat pohyb jednoho periferního váčku (žlutá šipka) směrem do vnitř buňky. Během pozorování se také objevil předtím nepozorovaný ESV váček (bílá šipka).

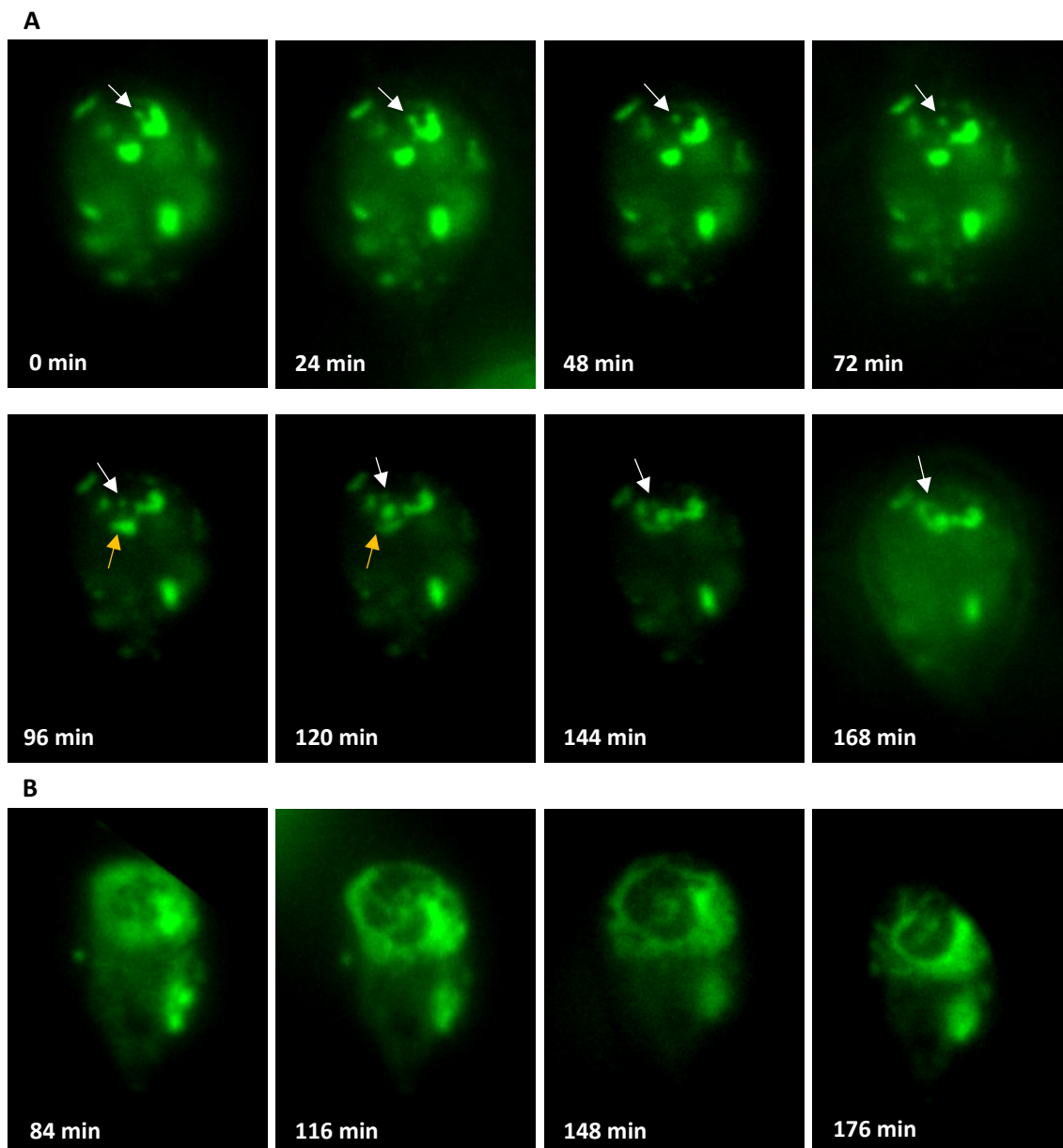
5.4.2 CWP1-Y-FAST

Dynamika ESV váčků byla také sledována pomocí konstruktu CWP1-Y-FAST. Stejně jako u předchozího konstruktu byly buňky pozorovány pomocí wide-field mikroskopu Nikon Ti-E, který byl vybaven komůrkou pro pozorování živých buněk při 37 °C a vyhříváním objektivu. Proto byly i v tomto případě buňky pozorovány v PBS. Jelikož buňky měly být pozorovány 15 hodin, byla do PBS přidána glukóza (v koncentraci 10 g/l) jako zdroj energie. Před pozorováním byla v buňkách indukována encystace po dobu 24 hodin. Buňky byly následně snímány každé čtyři minuty po dobu 18 hodin. Na počátku pozorování, hodinu po výměně encystačního média za PBS s přídáním HMBR substrátem, bylo možné pozorovat několik fenotypů encystujících buněk. Buňky s akumulovaným proteinem CWP1 v oblasti kolem jader (Obr. 30A), buňky s menším počtem větších váčků (Obr. 30B), buňky s větším počtem středně velkých váčků (Obr. 30C) a zakulacené buňky s velkým počtem malých váčků (Obr. 30D), které byly obvykle velmi pohyblivé. Po více než třech hodinách v PBS ovšem převažoval fenotyp buněk s menším počtem větších váčků (Obr. 31).



Obrázek 30: Zobrazení encystujících buněk *in vivo* prostřednictvím značeného CWP1 enzymatickým tagem Y-FAST. Buňky byly encystovány 24 hodin. Pozorovány byly hodinu po výměně encystačního média za PBS. V této době bylo možné pozorovat několik fenotypů buněk. A) Buňky s akumulovaným proteinem CWP1 v oblasti kolem jader. B) Buňky s menším počtem větších váčků. C) Buňky s větším počtem středně velkých váčků. D) zakulacené, vysoce pohyblivé buňky s velkým počtem malých váčků.

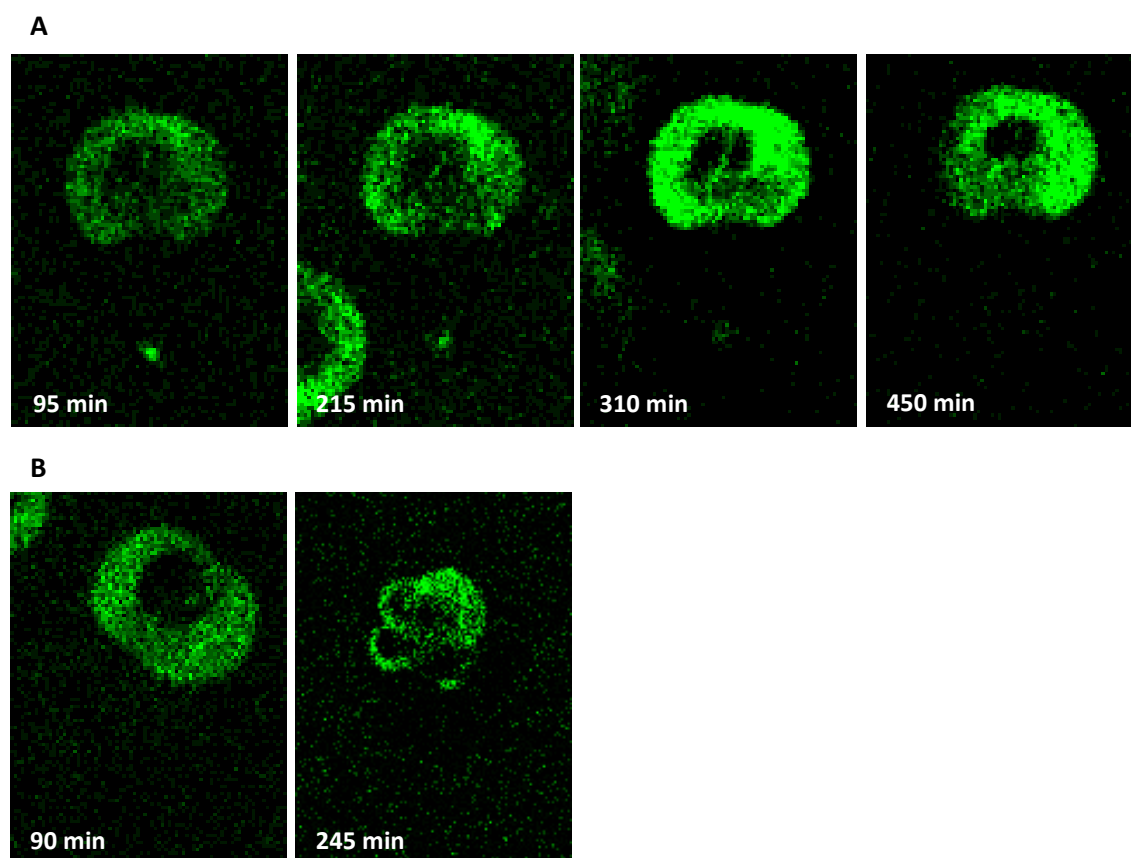
Přestože se ve většině buněk ESV váčkyjevily převážně nehybně, v některých buňkách bylo možné pozorovat i pohyblivé váčky. Pozorovali jsme také dělící se ESV váčky (Obr. 31A, Příloha 2). Podmínky, kterým byly vystaveny encystující buňky v tomto experimentu, patrně nesnižovaly životaschopnost pozorovaných buněk. I po 13 hodinách soustavného pozorování buněk, bylo možné detekovat signál enzymatického značení. V jedné buňce jsme pozorovali značený CWP1 protein, který se shromažďoval v oblasti adhezivního disku a zdálo se, že je transportován podél jeho struktury (Obr. 31B, Příloha 3). Nemohli jsme si ovšem být jistí, zda nejde o artefakt použitých experimentálních podmínek.



Obrázek 31: *In vivo* pozorování encystujících trofozoitů, kteří obsahovali CWP1 protein značený enzymatickým tagem Y-FAST (zeleně). Buňky byly encystovány 24 hodin, po kterých byly převedeny do PBS s obsahem glukózy. Pozorování bylo zahájeno 3 hodiny a 20 minut po výměně encystačního média za PBS. Snímek byl pořízen každé čtyři minuty. Čas uvedený u jednotlivých snímků značí dobu, která již uplynula od začátku pozorování. A) Během pozorování této buňky bylo možné spatřit malý ESV váček, který migroval buňkou (bílá šipka). Také bylo možné pozorovat váček, který se oddělil od většího ESV váčku (žlutá šipka). B) V této buňce došlo k akumulaci značeného CWP1 proteinu v oblasti adhezivního disku, podél kterého byl později transportován.

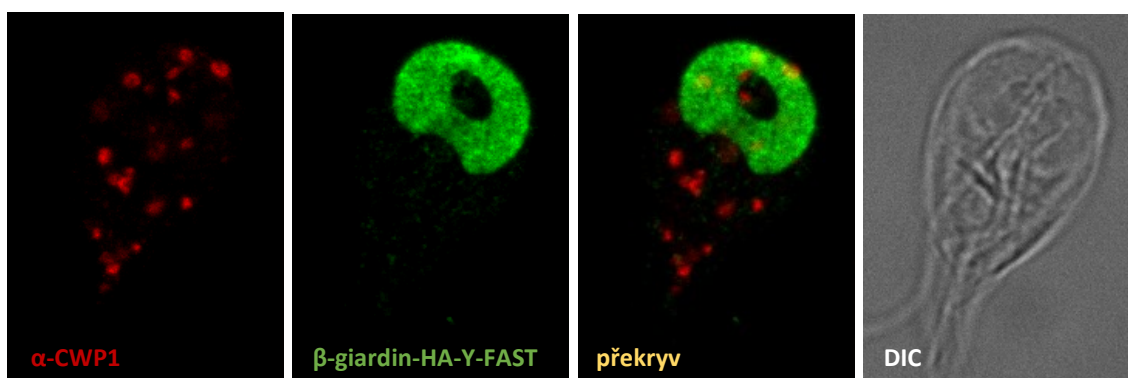
5.4.3 B-giardin-HA-Y-FAST

Jelikož pozorování encystujících buněk v PBS vedlo ke vzniku možných artefaktů, které nejsou spojené s normálním průběhem encystace, rozhodli jsme se buňky pozorovat za indukujících podmínek v encystačním médiu. To je možné použitím konfokální mikroskopie. Pro pozorování buněk, které obsahovaly chimerický protein β -giardin-HA-Y-FAST, byl použit konfokální mikroskop Leica TSC SP8, který byl vybaven komůrkou pro pozorování živých buněk při 37 °C s možností kontrolování obsahu atmosféry a vyhříváním objektivu. Před zahájením pozorování, kdy byl k buňkám přidán HMBR substrát, byly buňky encystovány dvě hodiny. Snímek byl pořízen každých pět minut po dobu 10 hodin a 30 minut. Kvůli ubývajícímu signálu bylo nutné substrát přidávat každé čtyři a půl hodiny. V pozorovaných buňkách ovšem nedošlo k žádným viditelným změnám ve struktuře adhezivního disku (Obr. 32A, Příloha 4). Bylo ovšem možné spatřit buňky s odlišným fenotypem adhezivního disku (Obr. 32B), které by mohly odpovídat jeho rozvinutí, ke kterému během encystace dochází.



Obrázek 32: *In vivo* pozorování encystačním médiem indukované buňky prostřednictvím chimerického proteinu β -giardin-HA-Y-FAST (zeleně). Buňky byly encystovány dvě hodiny, po kterých k nim byl přidán HMBR substrát a bylo zahájeno pozorování. Čas uvedený u jednotlivých snímků značí dobu, která již uplynula od začátku pozorování. A) Během pozorování stejné buňky nebyly zaznamenány žádné změny ve struktuře adhezivního disku. B) Během pozorování však byly pořízeny snímky velmi motilních buněk, které měly odlišný fenotyp adhezivního disku. Tyto fenotypy by mohly odpovídat otevírání struktury adhezivního disku.

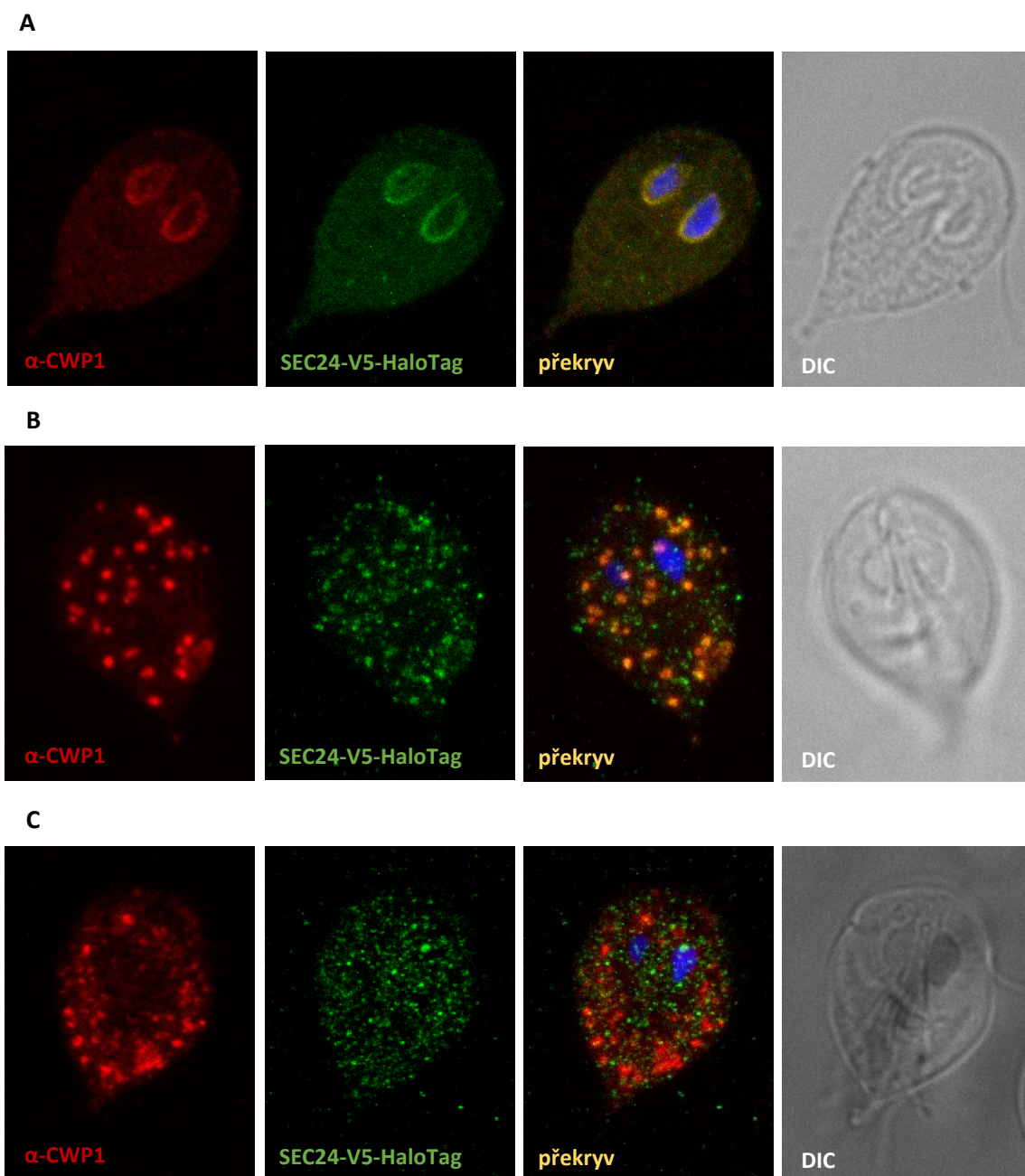
Jelikož *in vivo* nebyly pozorovány žádné změny v struktuře disku v rámci jedné buňky, pokusili jsme se změny pozorovat na fixovaných buňkách využitím metody nepřímé imunofluorescence. I v buňkách, které byly fixovány po 18 hodinách encystace, jsme nebyli schopni pozorovat změny ve struktuře disku. Pro zjištění fáze encystace, ve které se jednotlivé buňky nachází, byla použita protilátka specifická pro CWP1 protein. Ačkoliv v buňkách byly viditelné zformované ESV váčky v počátečních stádiích maturace, struktura adhezivního disku zůstala nezměněná (Obr. 33). Dá se tedy předpokládat, že ke změnám ve struktuře adhezivního disku dochází až v pozdějších fázích encystace.



Obrázek 33: Kolokalizace CWP1 proteinu s chimerickým proteinem β -giardin-HA-Y-FAST v encystujících trofozoitech *G. intestinalis* prostřednictvím nepřímé imunofluorescence. Toto zobrazení je výsledkem projekce maximální intenzity. Červeně je značen CWP1 pomocí primární protilátky α -CWP1 a sekundární protilátky konjugované s Alexou 594. Zeleň je značen protein β -giardin-HA-Y-FAST, který je značen pomocí primární protilátky α -HA (králík) a sekundární protilátky konjugované s Alexou 488. Překryv znázorňuje kolokalizaci ESV váčků a adhezivního disku. Na snímku nejsou viditelné změny ve struktuře adhezivního disku v buňkách, které již mají vytvořené ESV váčky. Encystující buňka ve viditelném spektru je znázorněna pomocí diferenciální interferenčního kontrastu (DIC). Buňky byly zafixovány po 18 hodinách encystace paraformaldehydovou fixací. Snímek byl pořízen pomocí konfokálního mikroskopu.

5.4.4 SEC24-like-V5-HaloTag a CWP1-Y-FAST

Buňky, které byly transformovány vektory CWP1-Y-FAST-pTG a SEC24-like-V5-HaloTag-pUC57-mini, měly sloužit k vizualizaci biogeneze ESV váčků. V předešlých experimentech jsme zjistili, že pozorování pomocí konfokální mikroskopie vede k rychlejší ztrátě signálu. Jelikož k HaloTagu nelze během experimentu přidávat čerstvý substrát, bylo zapotřebí zvolit vhodnou dobu, kdy pozorování zahájit. K tomuto účelu byly zhotoveny preparáty buněk, u kterých byla indukována encystace buďto dvě hodiny (Obr. 34A) nebo deset hodin (Obr. 34B a 34C). V buňkách, které byly indukovány dvě hodiny, byla patrná akumulace CWP1 proteinu v perinukleární cisterně ER. V těchto buňkách byla také pozorována silná kolokalizace SEC24-like-V5-HaloTag proteinu s CWP1 (Obr. 34A). Oba proteiny spolu ovšem kolokalizovaly i v pozdějších stádiích encystace, kdy už byly plně zformované ESV váčky (Obr. 34B). V této fázi již SEC24-like-V5-HaloTag vykazoval podobnou distribuci jako v neindukovaných buňkách (Obr. 26). Deset hodin po indukci encystace se vyskytovaly i buňky, ve kterých SEC24-like-V5-HaloTag kolokalizoval s ESV váčky již jen příležitostně (Obr. 34C).

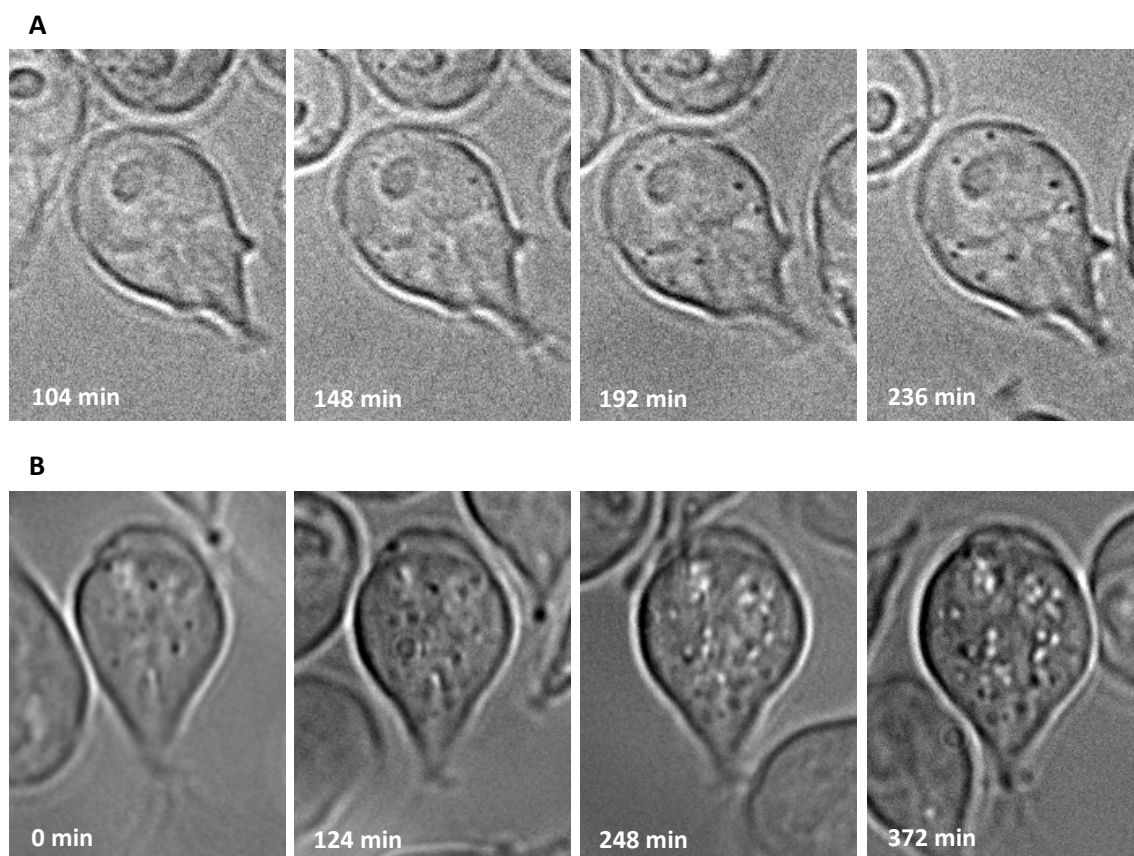


Obrázek 34: Kolokalizace chimerického proteinu SEC24-like-V5-HaloTag s CWP1 prostřednictvím nepřímé imunofluorescence. Červeně je značen protein CWP1 pomocí primární protilátky α -CWP1 a sekundární protilátky konjugované s fluoroforem Alexa 594. Zeleně je značen SEC24-like-V5-HaloTag pomocí metody nepřímé imunofluorescence použitím primární protilátky specifické pro V5 tag a sekundární protilátky konjugované s Alexou 488. Modře je na překryvu znázorněna DNA v jádrech barvením DAPI. Zobrazení je výsledkem projekce maximální intenzity více vrstev. DIC zobrazuje odpovídající buňku v průchozím světle. Buňky byly fixovány formaldehydovou fixací. Snímek byl pořízen pomocí konfokálního mikroskopu. A) Buňka fixovaná po dvou hodinách indukovaní encystace. Na snímku je patrná akumulace obou sledovaných proteinů v perinukleární oblasti. B) Buňka byla fixována po deseti hodinách inkubace v encystačním médiu. Stále je patrná silná kolokalizace obou sledovaných proteinů. C) Buňka byla fixována po deseti hodinách inkubace v encystačním médiu. Na snímku jsou viditelné ESV váčky, které jsou lokalizovány především v periferních oblastech buňky. I zde je možné pozorovat přítomnost SEC24-like-V5-HaloTag proteinu v blízkosti některých ESV váček.

Následný pokus o pozorování buněk, které obsahovaly oba zde popisované konstrukty, ovšem nebyl úspěšný a z časových důvodů již pokus nebylo možné opakovat.

5.5 *In vivo* pozorování encystace netransformovaných buněk *G. intestinalis*

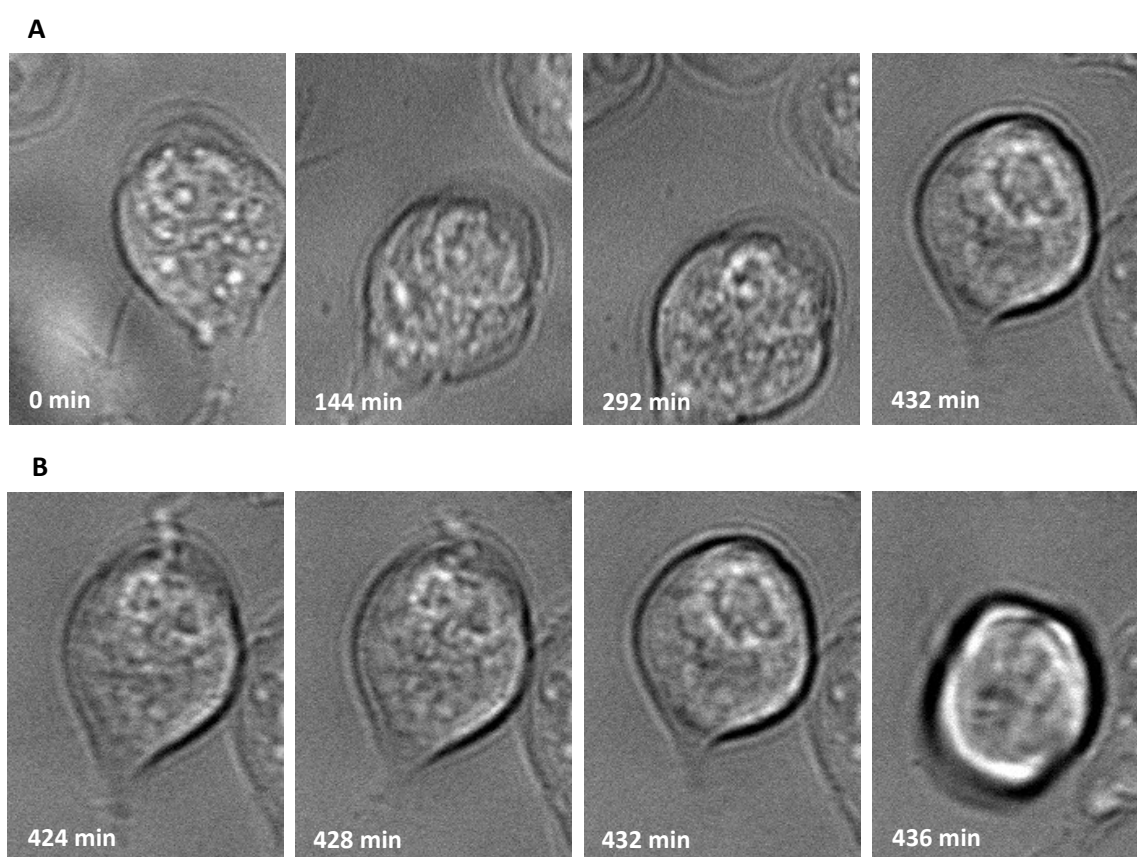
ESV váčky jsou během encystace dobře viditelné i v průchozím světle, je-li k jejich pozorování použito zobrazení DIC. Proto jsme se rozhodli pozorovat průběh encystace i v netransformovaných buňkách pomocí tohoto zobrazení. Srovnání průběhu encystace v netransformovaných buňkách kmene WB (ATCC 30957) a v transformovaných buňkách, které obsahovaly enzymaticky značenou formu CWP1 proteinu, by také umožnilo určit, zda konstrukty nenarušují průběh encystace. Zároveň by toto pozorování umožnilo vytipovat rozhodující momenty v dynamice ESV váček pro následné studie na transformovaných liniích. Jelikož v předchozích pokusech vysoká motilita buněk znesnadňovala dlouhodobé pozorování jednotlivých buněk, rozhodli jsme se jejich pohyb omezit přidáním agarózy do encystačního média během pozorování. Jako optimální se projevila 0,5% koncentrace agarózy. Během dlouhodobého pozorování ovšem docházelo k jejímu vysychání, proto byla tato vrstva převršena tenkou vrstvou encystačního média bez obsahu agarózy. Nejprve jsme se rozhodli pozorovat počáteční fáze encystace během 12 hodin indukce encystace. Pozorování bylo zahájeno hodinu po výměně kultivačního média za encystační a



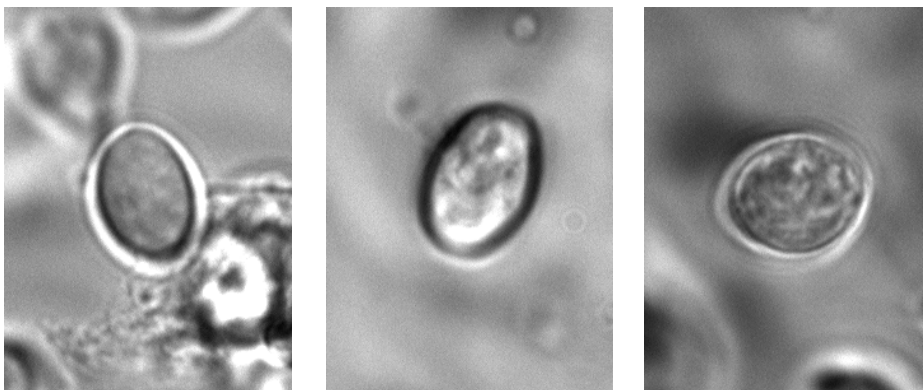
Obrázek 35: *In vivo* pozorování encystujících trofozoitů kmene WB (ATCC 30957). Buňky byly pozorovány v encystačním médiu s 0,5% agarózou. Čas uvedený u jednotlivých snímků značí dobu, která již uplynula od začátku pozorování. A) Pozorování buněk bylo zahájeno hodinu po výměně kultivačního média za encystační. Snímány byly buňky každé čtyři minuty. Přibližně dvě hodiny od začátku pozorování bylo možné spatřit ESV váčky. V následujících dvou hodinách došlo k zvětšování ESV váček, které během pozorování zůstaly na stejné pozici v rámci buňky. B) Pozorování buněk bylo zahájeno šest hodin od počátku indukce encystace. Pozorována byla buňka, která již obsahovala několik ESV váček. Během následujících šesti hodin došlo k značnému nárůstu počtu ESV váček v buňce. Došlo také k zvětšení a zakulacení sledované buňky. Snímky byly pořízeny prostřednictvím wide-field mikroskopie zobrazením DIC.

snímek byl pořízen každé čtyři minuty po dobu čtyř hodin. Výskyt ESV váčků bylo možné detekovat přibližně tři hodiny od indukce encystace (Obr. 35A, Příloha 5). S přibýtkem ESV váčků v buňce docházelo k zakulacování buněk. Většina ESV váčků zůstávala v rámci buňky nehybná a bylo možné pozorovat jejich postupné zvětšování (Obr. 35, Příloha 6).

Dále jsme přistoupili k pozorování buněk, které byly před začátkem snímání encystovány 12 hodin. Pozorovací podmínky byly shodné s předešlým provedeným pokusem. Bylo možné pozorovat buňku, která měla na začátku pozorování ve své cytoplasmě značný počet velkých váčků, které se postupem času rozpadly na větší počet malých váčků. Tato buňka před odplaváním tvořila oválně vypadající buňku, která vzhledově připomínala cystu (Obr. 36, Příloha 7). Během pozorování bylo také možné spatřit dělící se buňky, které ve své cytoplasmě obsahovaly ESV váčky. Na konci pozorování bylo možné v médiu najít cysty (Obr. 37).



Obrázek 36: *In vivo* pozorování encystujících trofozoitů *G. intestinalis* kmene WB (ATCC 30957). Buňky byly pozorovány v encystačním médiu s 0,5% agarózou. Čas uvedený u jednotlivých snímků značí dobu, která již uplynula od začátku pozorování. Buňky byly pozorovány po 12 hodinách encystace. Snímky byly pořízovány každé čtyři minuty. A) Na začátku pozorování obsahovala sledovaná buňka značný počet velkých ESV váčků. Během pozorování se zdálo, že se tyto váčky rozpadly na větší počet menších váčků. Buňka se na konci pozorování zakulatila. Během snímání se sledovaná buňka občas částečně vyskytovala mimo záběr. B) Poslední momenty stejné buňky před jejím pohybem mimo zorné pole. Poslední snímek zobrazuje buňku, která svým oválným tvarem již připomíná cystu. Snímky byly pořízeny prostřednictvím wide-field mikroskopie zobrazením DIC.



Obrázek 37: Cysty po 12 hodinách encystace v encystačním médiu, následovaných 12 hodinami encystace v encystačním médiu s 0,5% agarózou. Snímek byl pořízen pomocí wide-field mikroskopie v zobrazení DIC.

6 Diskuze

Dosavadní znalosti o dynamice encystace byly získávány především porovnáváním fixovaných preparátů a statickou analýzou morfologie pozorovaných buněčných struktur. Vlastní stanovení posloupnosti jednotlivých dějů bylo tak určováno na základě převažujícího fenotypu ve sledovaných časových bodech, vztažených k počátku indukce encystace. Trofozoiti *G. intestinalis* jsou ovšem schopni iniciovat encystaci pouze v G₂ fázi svého životního cyklu po replikaci jaderné DNA (Bernander et al., 2001). Jelikož v kultuře se buňky vyskytují v různých fázích svého buněčného cyklu (Bernander et al., 2001), je proces encystace v rámci populace asynchronní (Erlandsen et al., 1996). Poměr encystujících buněk a výtěžek encystace je značně ovlivněn i zvolením encystačního protokolu (Einarsson et al., 2016), což potvrzují i naše výsledky, které ukázaly, že tzv. Uppsala encystační protokol byl účinnější než dvou-krokový protokol (viz sekce 5.1). Dále může hrát roli i populační hustota (Gillin et al., 1987) či výběr kmene *G. intestinalis* (Kane et al., 1991). Jelikož každá laboratoř využívá jinou kombinaci uvedených faktorů, které mohou ovlivnit dynamiku encystace, existují nesrovnalosti ohledně posloupnosti některých dějů v rámci encystace. Jako řešení se nabízí sledování jedné buňky *in vivo* během celého procesu encystace.

V předešlých studiích byly pro sledování encystačních procesů použity chimerické proteiny, které byly fúzované s GFP (Hehl et al., 2000). Ten ovšem pro zformování svého fluoroforu potřebuje přítomnost molekulárního kyslíku (Heim et al., 1994). Jeho používání v anaerobních organismech je proto problematické. Je tedy nutné hledat jiné metody značení proteinů, které by umožnily sledování buněčných struktur *in vivo*. V této práci byly pro studování dynamiky encystace *in vivo* vybrány enzymatické tagy HaloTag a Y-FAST. Funkčnost HaloTagu v *G. intestinalis* byla již prokázána při pozorování mitosomů *in vivo* (Martincová et al., 2012; Voleman et al., 2017). Tato práce poprvé zavádí enzymatické značení *in vivo* pomocí enzymatického tagu Y-FAST u anaerobního eukaryotického organismu.

6.1 Exprese chimerických proteinů v *G. intestinalis*

Všechny uvedené konstrukty (Sekce 5.2) se podařilo úspěšně vložit do vektorů, které byly elektroporovány do netransformovaných buněk *G. intestinalis*. Pro každý vytvořený plazmid se podařilo vyselektovat alespoň jednu pozitivní linii buněk.

V linii buněk, která nesla konstrukt CenH3-HA-Y-FAST, se ovšem nepodařilo potvrdit expresi chimerického proteinu. Je možné, že exprese tohoto proteinu byla nižší, než jsou detekční limity metod, které byly použity pro ověření exprese proteinu v dané linii. Je také možné, že exprese tohoto proteinu je regulována v rámci životního cyklu. Během vytváření jednotlivých konstruktů byly s jednotlivými geny klonovány i přilehlé 5'- nepřekládané oblasti. Důvodem byla snaha zajistit co možná nejpřirozenější hladinu exprese sledovaného proteinu. V případě giardiového homologu CenH3 proteinu, jehož funkcí je stavba chromatinu v centromerické oblasti chromozomů (Sagolla et al., 2006), tak může být jeho exprese závislá na fázi životního cyklu, ve kterém se buňka nachází. Obohacení populace trofozoitů o buňky vstupující do mitózy (Nohýnková et

al., 2006) by tak mohlo usnadnit detekci tohoto proteinu, neboť v tomto momentu jsou chromozomy i s centromerami již replikovány. Jelikož selekci na přítomnost plazmidu, který nesl konstrukt s CenH3-HA-Y-FAST, přežila pouze jedna linie buněk ze tří transformovaných, je také možné, že je exprese daného konstruktů pro buňky toxická. V pokusech s tímto konstruktem jsme se proto rozhodli nepokračovat.

V linii buněk, které nesly plazmid Ndc80-HA-Y-FAST-pTG, se podařilo ověřit expresi chimerického proteinu Ndc80-HA-Y-FAST. Tento protein by měl být giardiový homolog kinetochorového proteinu Ndc80. Při ověření jeho lokalizace, byl často pozorován v asociaci s cytoskeletálními útvary (Obr. 20A). V *S. cerevisiae* váže Ndc80 v komplexu s dalšími proteiny mikrotubuly dělicího vřeténka (Wei et al., 2007). Je možné, že exprese tohoto konstruktů způsobila navýšení hladiny Ndc80 proteinu nad jeho přirozený výskyt, a to i přestože byl exprimován pod svým přirozeným promotorem. To mohlo způsobit asociaci Ndc80-HA-Y-FAST s mikrotubuly v cytoplasmě, jelikož k nim má přirozenou afinitu. V některých buňkách byla pozorována i jaderná lokalizace, signál byl ovšem velmi slabý a nelze s určitostí říci, jestli se nejedná o artefakt. Přidání enzymatického tagu na C-konec Ndc80 mohlo znemožnit translokaci proteinu z cytoplazmy do jádra. Také je možné, že protein translokuje do jádra až ve chvíli, kdy dochází k vazbě centromer na dělicí vřeténko. Ke zjištění lokalizace proteinu během mitózy by ovšem bylo nutné obohatit kulturu o mitotické buňky. Z důvodu experimentálních komplikací jsme i tento konstrukt dále v diplomovém projektu nepoužívali. Oba konstrukty vytvořené pro sledování mitózy (CenH3-HA-Y-FAST, Ndc80-HA-Y-FAST) budou však dále využity pro sledování dynamiky mitózy v naší laboratoři.

U linií buněk, které obsahovaly konstrukty chimerických proteinů CWP1-Y-FAST, CWP1-HaloTag, β -giardin-HA-Y-FAST a SEC24-like-V5-HaloTag, byla potvrzena exprese chimerických proteinů, i jejich správná lokalizace.

6.2 Funkčnost enzymatického značení v *G. intestinalis*

Dále bylo nutné zjistit, zda jsou exprimované enzymatické tagy funkční a jestli neovlivňují funkci proteinů, se kterými jsou fúzovány. Funkčnost enzymatických tagů byla zjišťována *in vivo* a v případě konstruktů s HaloTagem také ve fixovaných buňkách.

Linie buněk obsahující konstrukt CWP1-Y-FAST byla po indukci encystace schopná tvořit ESV váčky, které obsahovaly funkční enzymaticky značený CWP1 protein (Obr. 16). Přidání enzymatického tagu na jeho C-konec tedy nebrání vstupu proteinu do sekretorické dráhy. Během snímání encystujících buněk bylo také možné pozorovat buňky, které vzhledově připomínaly cysty a které na svém povrchu měly enzymaticky značený CWP1. To naznačuje, že enzymatický tag na C-konci CWP1 nebrání jeho sekreci. Pozorované „cysty“ byly ovšem kulovitěho tvaru (Obr. 28). Přítomnost enzymatického tagu by tak mohla ovlivňovat vznik stěny cysty. Enzymatický tag by mohl bránit tvorbě polymerů s dalšími proteiny či se sacharidovou složkou stěny. V těchto buňkách by mohl vznikat špatný poměr CWP proteinů kvůli zvýšené míře exprese CWP1 proteinu,

což by také mohlo vést k deformaci stěny cysty. V publikovaných studiích, ve kterých byl sledován chimerický protein CWP1-GFP ovšem detekovali i cysty oválného tvaru (Hehl et al., 2000). Vzhledem k menší velikosti Y-FASTu (Plamont et al., 2016) by tedy tento tag neměl interferovat s tvorbou komplexů o nic více než GFP. Je tedy možné, že pozorované cysty pouze nebyly zcela maturované.

Obdobná situace byla pozorována i u linie buněk s konstruktem CWP1-HaloTag. Buňky byly schopné vytvářet ESV váčky (Obr. 17) a funkčnost tagu byla ověřena i v živých buňkách (Obr. 18). Cysty, které měly na povrchu CWP1-HaloTag ovšem také byly kulovitěho vzhledu (Obr. 27).

Linie buněk, která obsahovala konstrukty CWP1-Y-FAST a SEC24-like-V5-HaloTag, nesla funkční formu enzymaticky značeného SEC24-like proteinu (Obr. 26). SEC24-like-V5-HaloTag, který byl detekován pomocí enzymatického značení, lokalizoval do struktur, které vzhledově odpovídaly struktuře ERES *G. intestinalis* v publikované studii (Obr. 6) (Faso et al., 2013). I tento ortolog proteinu SEC24-like tedy lokalizuje do struktur ERES. Předchozí studie popisovaly lokalizaci pouze jeho ortologu s identifikačním kódem GL50803_17164, kterého autoři označili jako SEC24-like 1. Pro námi využívaný protein (GL50803_16520) byl navrhnout název SEC24-like 2 (Faso et al., 2013). Tyto buňky byly schopné vytvářet ESV váčky (Obr. 34). Nepodařilo se nám ovšem ověřit funkčnost enzymatických tagů v živých buňkách. V tomto případě je možné, v období po testování konstruktu na fixovaných buňkách došlo u dané linie buněk ke ztrátě exprese proteinu.

Funkčnost enzymatického značení v buňkách nesoucích plazmid β -giardin-HA-Y-FAST byla ověřena *in vivo* (Obr. 24). Během jejich kultivace či při jejich pozorování *in vivo* nebylo patrné narušení schopnosti buněk adherovat pomocí adhezivního disku, ve kterém je protein lokalizován.

6.3 Live imaging encystujících trofozoitů *G. intestinalis*

6.3.1 Dynamika ESV váčků

V počátečních experimentech byla pro pozorování buněk zvolena wide-field mikroskopie, která měla umožnit dlouhodobé pozorování buněk. Jelikož média pro kultivaci a encystaci buněk *G. intestinalis* obsahují chemicky nedefinované složky, které vykazují vysokou autofluorescenci, bylo nutné buňky pozorovat v PBS, které ovšem encystaci neindukuje. Tyto podmínky vyžadovaly delší dobu indukce encystace (17 hodin) před vlastním pozorováním, aby během následných neindukujících podmínek došlo k dovršení encystačních procesů. Zvolená doba indukce buněk v encystačním médiu před jejich přenesením do PBS by měla být dostatečná. Předchozí studie totiž naznačovaly, že pro dokončení encystace postačí indukovat encystaci i výrazně kratší dobu. Jedna studie stanovila tuto dobu na rozpětí 7–20 hodin, přičemž by nemělo záležet na použitém encystačním médiu (Morf et al., 2010). Další studie dokonce naznačovala, že by mělo stačit 3–6 hodin indukce, aby buňka byla schopná dokončit encystaci. 12 hodin indukce by pak mělo stačit pro dokončení encystace u většiny buněk v kultuře (Sulemana et al., 2014).

Linie buněk s konstruktem CWP1-HaloTag byla snímána každou minutu po dobu dvou hodin. V této době ovšem nebyla zaznamenána žádná výrazná dynamika ESV váčků (Obr. 29, Příloha 1). To je konzistentní s předchozím pozorováním dynamiky ESV váčků za použití chimerického proteinu CWP1-GFP (Stefanic et al., 2009). Tito autoři ovšem post-experimentální analýzou obrazu došli k názoru, že ESV váčky jsou propojeny dynamickou sítí tubulárních struktur (Obr. 2A) (Stefanic et al., 2009), které v našich záběrech pozorovány nebyly. Je možné, že rozlišení našich záběrů není dostatečné pro detekci takovýchto struktur.

Pro další pozorování buněk *in vivo* byl využit konstrukt CWP1-Y-FAST. V buňkách byla encystace indukována 24 hodin před pozorováním. Tato doba by měla být dostatečná pro následné pozorování buněk, které jsou v posledních fázích před sekrecí CWP proteinů, jelikož encystace buněk po dobu 25 hodin za použití Uppsala encystačního protokolu vedla k vzniku značného množství cyst (viz sekce 5.1). Jelikož v předchozím experimentu jsme během dvou hodin nebyli schopni pozorovat výraznou dynamiku ESV váčků, rozhodli jsme se buňky pozorovat výrazně delší dobu (18 hodin). Kvůli vysvěcování fluoroforu jsme byli nuceni prodloužit dobu mezi snímáním jednotlivých obrazů na čtyři minuty. Tato doba byla stále dostatečná pro sledování jednotlivých buněk. Kvůli motilitě buněk je jejich sledování po delším časovém úseku obtížné. Za těchto podmínek se nám podařilo sledovat stejnou encystující buňku po dobu necelých tří hodin. Dle dostupných informací je to nejdelší doba, po kterou byl někdo schopen pozorovat stejnou buňku během encystace pomocí fluorescenční mikroskopie.

Hodinu po převedení buněk do PBS bylo možné pozorovat buňky různých fenotypů. Jelikož je encystace v rámci populace značně asynchronní (Erlandsen et al., 1996), tyto fenotypy pravděpodobně představují různé fáze maturace ESV váčků (McCaffery et al., 1994; Lanfredi-Rangel et al., 2003; Konrad et al., 2010). Nejdříve dochází k expresi CWP1 v periferních oblastech jader (Obr. 30A) - CWP1 protein ještě nebyl zcela transportován z ER. Následuje tvorba malého počtu velkých ESV váčků (Obr. 30B), které se v následující fázi rozpadají na menší a početnější váčky (Obr. 30C a 30D). Fenotyp zakulacených buněk s velkým počtem malých váčků (Obr. 30D) tak zřejmě odpovídá buňkám před sekrecí materiálu na povrch buňky. Navzdory technickým obtížím jsme byli schopni pozorovat určitou dynamiku ESV váčků (Obr. 31A, Příloha 2). Ve vybrané buňce byla pozorována migrace malého ESV váčku a odštěpení váčku z většího váčku. Mohlo se také jednat o vznik ESV váčku z míst ER, kde byl protein akumulován. Pro to svědčí nepravidelný tvar kompartmentu, protože zralé ESV váčky jsou kulovité (Lanfredi-Rangel et al., 2003).

Pro charakterizaci této časně fáze tvorby ESV váčků jsme vytvořili konstrukt obsahující protein SEC24-like 2, který lokalizuje do ERES struktur. V ERES dochází k tvorbě COPII váčků a jejich transportu do *cis*-Golgi (Béthune and Wieland, 2018; Marti et al., 2003a). U *G. intestinalis* by mohly podle předchozích prací ESV váčky vznikat homotypickou fúzí COPII váčků (Marti et al., 2003a). Z našich pozorování fixovaných buněk bylo patrné, že v raných fázích biogeneze ESV váčků (dvě hodiny od indukce) SEC24-like 2 silně kolokalizuje s CWP1 v perinukleárních oblastech (Obr. 34A), kde je tedy protein pravděpodobně preferenčně syntetizován. Tvorba ESV váčků v tomto čase ovšem pozorována nebyla, tak jako to bylo pozorováno v předešlých studiích (Faso et al., 2013). Tato nesrovnalost by mohla být vysvětlena použitím jiného kmene buněk WB a

odlišného encystačního protokolu. Kolokalizace s ESV váčky byla pozorována i v pozdějších fázích encystace (10 hodin od indukce), když již byly váčky plně zformované (Obr. 34B). V jiných buňkách byla pozorována pouze částečná kolokalizace obou proteinů (Obr. 34C). Mohlo by se tak jednat o různé fáze maturace ESV váček. Naše pozorování se však neshodují se studií, která tvrdí, že u plně zformovaných ESV váček již ke kolokalizace nedochází (Faso et al., 2013), a podporuje tak pozorování učiněné jinou skupinou (Zamponi et al., 2017). Důvodem těchto rozdílných pozorování může být odlišná doba pozorování od indukce encystace – mohlo tedy jít o jinou fázi maturace ESV. K vizualizaci ERES byl také použit jiný protein, SEC23-like (Faso et al., 2013). Ten by ovšem měl s proteinem SEC24-like tvořit heterodimer, funguje-li systém COPII váček u *G. intestinalis* stejným způsobem jako u opisthokontních organismů (Béthune and Wieland, 2018).

6.3.2 Dynamika adhezivního disku

Pozorování dynamiky adhezivního disku bylo umožněno pomocí konstruktů β -giardin-HA-Y-FAST. Výchozí pozorování transformované linie buněk v PBS nevedlo u části buněk k progresi encystace. Navíc byly pozorovány jevy, které pravděpodobně nesouvisí s normálním průběhem encystace (Obr. 31B). Z toho důvodu jsme optimalizovali pozorovací podmínky i techniku mikroskopování. Buňky byly pozorovány v komplexním indukčním médiu pomocí laserové konfokální mikroskopie. Další výhodou tohoto systému byla možnost regulace atmosféry v pozorovací komůrce mikroskopu a buňky tak bylo možné pozorovat za téměř anaerobních podmínek v přítomnosti 1 % kyslíku a 99 % dusíku. Laserová konfokální mikroskopie ovšem využívá vyšší intenzity světla při excitaci vzorků, a tak vede k rychlejšímu vysvěcování fluorescence a vyšší fototoxicitě. Buňky jsme pozorovali přes deset hodin a snímány byly každých pět minut, což stále umožňovalo sledování jednotlivých buněk. Excitace laserem ovšem vedla k rychlejšímu vysvěcování fluoroforu. Substrát bylo tedy nutné opakovaně přidávat během pozorování, což bylo technicky obtížné.

Během sedmi a půl hodin, po které se nám podařilo sledovat stejnou buňku, se nám však nepodařilo zaznamenat žádné změny ve struktuře jejího adhezivního disku (Obr. 32A, Příloha 4). Je však pravděpodobné, že v této konkrétní buňce bohužel nedocházelo k encystaci. Během snímání se nám ovšem podařilo zachytit buňky s odlišným fenotypem (Obr. 32B). Je možné, že tyto fenotypy představují rozplétající se spirálu disku. Abychom zjistili, po jaké době encystace dochází ke změnám ve struktuře disku, zhotovili jsme trvalé preparáty fixovaných buněk po 18 hodinách encystace. Kolokalizace s CWP1 nám umožnila přibližně určit, v jaké fázi encystace se buňky nachází. Na fixovaných preparátech jsme ovšem nebyli schopni najít výrazné změny ve struktuře adhezivního disku. Buňky, které nebyly zakulacené, ale již obsahovaly plně formované ESV váčky, měly stále intaktní strukturu disku (Obr. 33). Dá se tedy předpokládat, že strukturní změny nastávají až v pozdějších fázích encystace. To je v rozporu s pozorováním předešlých studií, které detekovaly změny ve struktuře disku již 1–2 hodiny od indukce encystace, které byly spojeny se ztrátou schopnosti adheze (Palm et al., 2005). Je možné, že fenotypy, které autoři pozorovali, nejsou spojené s encystací. Jimi pozorovaný adhezivní disk tvaru podkovy by mohl souviset s dynamikou disku, která je spojená s mechanismem adheze i u neencystujících buněk.

6.3.3 Dynamika encystace v netransformovaných buňkách *G. intestinalis*

Pro kontrolu průběhu encystace, byla encystace sledována v netransformovaných buňkách *G. intestinalis*. I zde byl pozorován vznik váčků, které většinou zůstávaly nehybné na stejném místě v rámci buňky. Váčky se začaly objevovat tři hodiny od indukce encystace (Obr. 35A). V průběhu pozorování docházelo ke zvětšování množství i změně velikosti jednotlivých váčků. Zároveň se buňky začaly postupně zakulacovat (Obr. 35B, Příloha 6). V další fázi pozorování byly buňky sledovány po 12 hodinách encystace (Obr. 36, Příloha 7). Zde se nám podařilo najít buňku, která již byla zakulacená a obsahovala větší počet velkých váčků a kterou se nám podařilo sledovat déle než sedm hodin. Váčky se postupně začaly vytrácet. Je možné, že došlo k jejich fragmentaci na menší váčky a případně k jejich sekreci. Jako poslední byla vidět oválná buňka, která připomínala tvar cysty a která již neadherovala k podkladu. Pozorované váčky byly považovány za ESV váčky, nemůžeme však vyloučit, zda se také nejedná o odlišné ECV váčky (Midlej et al., 2013).

V těchto pozorováních jsme se pokusili znehybnit buňky přidáním agarózy do encystačního média, ve kterém byly buňky pozorovány. I na konci pozorování adherovalo ke sklu velké množství buněk, částečná imobilizace buněk 0,5% agarózou se tak ukázala jako efektivní řešení vysoké mobility buněk v předchozích experimentech. Jelikož však nezralé cysty neadherují k podkladu, není zatím možné pozorovat pozdější fáze encystace touto metodou, ani je-li přidána agaróza. Pozorovací podmínky mají také vliv na efektivitu encystace v rámci populace, jelikož na konci pozorování bylo možné spatřit pouze omezené množství cyst (Obr. 37).

7 Závěr

Cílem této práce bylo vizualizovat dynamiku encystace střevního prvoka *G. intestinalis*. Za tímto účelem bylo vytvořeno několik konstruktů, které měly umožnit vizualizaci různých buněčných struktur *in vivo*. Konstrukty byly úspěšně vytvořeny a vpraveny do buněk *G. intestinalis*.

Konstrukty, které obsahovaly enzymaticky značenou formu CWP1 proteinu, se ukázaly jako funkční a umožnily sledování dynamiky ESV váčků *in vivo* v transformovaných buňkách. Jejich exprese ovšem způsobila deformaci tvaru vzniklých cyst.

Vizualizace adhezivního disku v průběhu encystace pomocí konstruktů β -giardin-HA-Y-FAST byla také úspěšná. Podařilo se nám pozorovat buňky, ve kterých nejspíše docházelo k rozplétání disku do podoby spirály, což bylo pozorováno i v předchozích studiích (Palm et al., 2005; Midlej and Benchimol, 2009). Podařilo se nám také pozorovat buňky, které již měly plně formované ESV váčky a intaktní strukturu disku. To je v rozporu s pozorováním, že ke změnám ve struktuře adhezivního disku dochází již v počátečních fázích encystace (Palm et al., 2005). Narušení struktury adhezivního disku až v pozdějších fázích encystace by buňkám *G. intestinalis* mohlo umožnit delší setrvání na epitelu tenkého střeva, a tak i zdárné dokončení encystace před jejich vyloučením ze zažívacího traktu. Nepodařilo se nám ovšem pozorovat změny ve struktuře adhezivního disku v rámci stejné buňky *in vivo*.

Proces encystace jsme také byli dlouhodobě schopni pozorovat i na netransformovaných buňkách *G. intestinalis*. To nám poskytlo kontrolu, se kterou je možné srovnávat proces encystace v transformovaných buňkách. Tato práce také demonstuje optimalizaci pozorovacích podmínek pro dlouhodobý live-imaging.

U konstruktů Ndc80-HA-Y-FAST a CenH3-HA-Y-FAST, které měly vizualizovat struktury v jádře, se ovšem nepodařilo ověřit jejich správnou lokalizaci a v případě CenH3-HA-Y-FAST ani jeho expresi.

U linie buněk, která obsahovala jak konstrukt CWP1-Y-FAST, určený pro vizualizaci ESV váčků, a konstrukt SEC24-like-HA-Y-FAST, který má značit ERES a COPII váčky, se nepodařilo vizualizovat značené struktury *in vivo*. Mohlo dojít ke ztrátě exprese, a tak je v budoucnu nutné pokusy opakovat s nově vymraženými buňkami či v případě nutnosti konstrukty znovu do buněk elektroporovat.

Některé ze zde vytvořených konstruktů lze využít i pro sledování dynamiky buněčných struktur i během jiných buněčných procesů jako jsou sekrece či dělení buněk. Poskytují také nástroj pro hlubší porozumění procesu encystace a jejich budoucí využití by mohlo vést k vyjasnění některých nesrovnalostí, které se v literatuře vyskytují. Tato práce také poprvé demonstuje funkčnost enzymatického tagu Y-FAST u anaerobního organismu. Tento systém by tak mohl mít širší využití pro studium živých buněk i u dalších anaerobních organismů.

8 Seznam často používaných zkratek

ADI	arginine deiminase
AP	Adaptor protein
ARF	ADP-ribosylation factor
ARL	ADP-ribosylation factor-like protein
C ₆ -NDB-ceramid	N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-aminocaproyl)-erythro-sphingosine
CDK2	Cyklin-dependentní kináza 2
CenH3	Centromerický histon 3
COP	Coatomer protein
CP2	Cysteine protease 2
CWM	Materiál stěny cysty
CWMco	Kondenzovaný CWM
CWMfl	Fluidní CWM
CWP1, 2, 3	Cyst wall protein 1, 2, 3
CWS	Cyst wall synthase
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DhaA	Haloalkan dehalogenáza
DIC	diferenciální interferenční kontrast
DIC	Diferenciální interferenční kontrast
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DRP	Dynamin-related protein
ECV	encystation carbohydrate-positive vesicle
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFCP	EGF-like Cyst Protein
ER	Endoplazmatické retikulum
ERES	ER exit site
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ESCP	encystation-specific cysteine protease
ESV	Encystation-specific vesicle
GalNAc	N-acetylgalaktosylamin
GalNAcT	N-acetylgalaktosylamin transferáza
GAP	GTPase-activating protein
GDP	guanosindifosfát
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFP	Green fluorescent protein
GSP	Granule-specific protein
GTP	guanosintrifosfát

HA	Hemagglutininový tag
HaloTag	Modifikovaná halogen dehalogenáza
HBR	4-hydroxybenzyliden-rhodanin
HCNCp	High cysteine non-variant cyst protein
HMBR	4-hydroxy-3-methylbenzyliden-rhodanin
LRR	Leucine-rich repeats
MAP	mitogen-activated protein
PDI	protein disulfid isomeráza
PV	Periferní vakuoly
PYP	Photoactive Yellow Protein
SAR1	GTP-binding protein SAR1
SEM	Snímací elektronový mikroskop
SNARE	SNAP (soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein) receptor)
SUMO	Small ubiquitin-related modifier
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
TMR	tetramethylrhodamin
UPF1	up-frameshift 1 (UPF1)
UTR	Nepřekládaná oblast
VSP	Variant-specific surface protein
Y-FAST	Yellow fluorescence-activating and absorption-shifting tag

9 Seznam použité literatury

- Arguello-Garcia, R., Arguello-Lopez, C., Gonzalez-Robles, A., Castillo-Figueroa, A. M. and Ortega-Pierres, M. G. (2002). Sequential exposure and assembly of cyst wall filaments on the surface of encysting *Giardia duodenalis*. *Parasitology* **125**, 209–219.
- Barash, N. R., Nosala, C., Pham, J. K., McNally, S. G., Gourguechon, S., McCarthy-Sinclair, B. and Dawson, S. C. (2017). *Giardia* colonizes and encysts in high-density foci in the murine small intestine. *mSphere* **2**, e00343-16.
- Bernander, R., Palm, J. E. D. and Svard, S. G. (2001). Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell. Microbiol.* **3**, 55–62.
- *Béthune, J. and Wieland, F. T. (2018). Assembly of COPI and COPII vesicular coat proteins on membranes. *Annu. Rev. Biophys.* **47**, 63–83.
- *Brodsky, F. M. (2012). Diversity of clathrin function: New tricks for an old protein. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 309–336.
- Castillo-Romero, A., Leon-Avila, G., Wang, C. C., Perez Rangel, A., Camacho Nuez, M., Garcia Tovar, C., Ayala-Summano, J. T., Luna-Arias, J. P. and Hernandez, J. M. (2010). Rab11 and actin cytoskeleton participate in *Giardia lamblia* encystation, guiding the specific vesicles to the cyst wall. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, e697.
- Chatterjee, A., Carpentieri, A., Ratner, D. M., Bullitt, E., Costello, C. E., Robbins, P. W. and Samuelson, J. (2010). *Giardia* cyst wall protein 1 is a lectin that binds to curled fibrils of the GalNAc homopolymer. *PLoS Pathog.* **6**, e1001059.
- Chávez-Munguía, B., Cedillo-Rivera, R. and Martínez-Palomo, A. (2004). The ultrastructure of the cyst wall of *Giardia lamblia*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **51**, 220–6.
- Chen, Y.-H., Su, L.-H. and Sun, C.-H. (2008a). Incomplete nonsense-mediated mRNA decay in *Giardia lamblia*. *Int. J. Parasitol.* **38**, 1305–1317.
- Chen, Y.-H., Su, L.-H., Huang, Y.-C., Wang, Y.-T., Kao, Y.-Y. and Sun, C.-H. (2008b). UPF1, a conserved nonsense-mediated mRNA decay factor, regulates cyst wall protein transcripts in *Giardia lamblia*. *PLoS One* **3**, e3609.
- Chiu, P.-W., Huang, Y.-C., Pan, Y.-J., Wang, C.-H. and Sun, C.-H. (2010). A novel family of cyst proteins with epidermal growth factor repeats in *Giardia lamblia*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, e677.
- Cho, C.-C., Su, L.-H., Huang, Y.-C., Pan, Y.-J. and Sun, C.-H. (2012). Regulation of a Myb transcription factor by cyclin-dependent kinase 2 in *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **287**, 3733–50.
- Chuang, S.-F., Su, L.-H., Cho, C.-C., Pan, Y.-J. and Sun, C.-H. (2012). Functional redundancy of two Pax-like proteins in transcriptional activation of cyst wall protein genes in *Giardia lamblia*. *PLoS One* **7**, e30614.
- Coverley, D., Laman, H. and Laskey, R. A. (2002). Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation. *Nat. Cell Biol.* **4**, 523–528.
- Crossley, R. and Holberton, D. V (1983). Characterization of proteins from the cytoskeleton of

- Giardia lamblia*. *J. Cell Sci.* **59**, 81–103.
- Das, S. and Gillin, F. D.** (1996). *Giardia lamblia*: increased UDP-N-acetyl-D-glucosamine and N-acetyl-D-galactosamine transferase activities during encystation. *Exp. Parasitol.* **83**, 19–29.
- Davids, B. J., Reiner, D. S., Birkeland, S. R., Preheim, S. P., Cipriano, M. J., McArthur, A. G. and Gillin, F. D.** (2006). A new family of giardial cysteine-rich non-VSP protein genes and a novel cyst protein. *PLoS One* **1**, e44.
- De Chatterjee, A., Mendez, T. L., Roychowdhury, S. and Das, S.** (2015). The assembly of GM1 glycolipid- and cholesterol-enriched raft-like membrane microdomains is important for giardial encystation. *Infect. Immun.* **83**, 2030–42.
- DuBois, K. N., Abodeely, M., Sakanari, J., Craik, C. S., Lee, M., McKerrow, J. H. and Sajid, M.** (2008). Identification of the major cysteine protease of *Giardia* and its role in encystation. *J. Biol. Chem.* **283**, 18024–31.
- Ebneter, J. A., Heusser, S. D., Schraner, E. M., Hehl, A. B., Faso, C., Samuelson, J., Bushkin, G. G., Chatterjee, A., Robbins, P. W., Ankarklev, J., et al.** (2016). Cyst-Wall-Protein-1 is fundamental for Golgi-like organelle neogenesis and cyst-wall biosynthesis in *Giardia lamblia*. *Nat. Commun.* **7**, 1–10.
- Einarsson, E., Troell, K., Hoepfner, M. P., Grabherr, M., Ribacke, U. and Svärd, S. G.** (2016). Coordinated changes in gene expression throughout encystation of *Giardia intestinalis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004571.
- Elias, E. V., Quiroga, R., Gottig, N., Nakanishi, H., Nash, T. E., Neiman, A. and Lujan, H. D.** (2008). Characterization of SNAREs determines the absence of a typical Golgi apparatus in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **283**, 35996–6010.
- Ellis, J. G., Davila, M. and Chakrabarti, R.** (2003). Potential involvement of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in encystation of a primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **278**, 1936–1945.
- Erlandsen, S. L., Bemrick, W. J., Pawley, J. and Pawley, J.** (1989). High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *Source J. Parasitol. J. Parasitol* **75**, 787–797.
- Erlandsen, S. L., Macechko, P. T., van Keulen, H. and Jarroll, E. L.** (1996). Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. *J. Eukaryot. Microbiol.* **43**, 416–29.
- Faso, C., Konrad, C., Schraner, E. M. and Hehl, A. B.** (2013). Export of cyst wall material and Golgi organelle neogenesis in *Giardia lamblia* depend on endoplasmic reticulum exit sites. *Cell. Microbiol.* **15**, 537–553.
- Faubert, G., Reiner, D. S. and Gillin, F. D.** (1991). *Giardia lamblia*: Regulation of secretory vesicle formation and loss of ability to reattach during encystation in vitro. *Exp. Parasitol.* **72**, 345–354.
- Gaechter, V., Schraner, E., Wild, P. and Hehl, A. B.** (2008). The single dynamin family protein in the primitive protozoan *Giardia lamblia* is essential for stage conversion and endocytic transport. *Traffic* **9**, 57–71.
- Gerwig, G. J., van Kuik, J. A., Leeftang, B. R., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G., Karr, C. D. and Jarroll, E. L.** (2002). The *Giardia intestinalis* filamentous cyst wall contains a novel beta(1-3)-N-acetyl-D-galactosamine polymer: a structural and conformational study.

- Gillin, F., Reiner, D., Gault, M., Douglas, H., Das, S., Wunderlich, A. and Sauch, J. (1987). Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* in vitro. *Science* (80-). **235**, 1040–1043.
- Gillin, F. D., Reiner, D. S. and Boucher, S. E. (1988). Small-intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia* in vitro. *Infect. Immun.* **56**, 705–707.
- Gottig, N., Elías, E. V., Quiroga, R., Nores, M. J., Solari, A. J., Touz, M. C. and Luján, H. D. (2006). Active and passive mechanisms drive secretory granule biogenesis during differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **281**, 18156–66.
- Hehl, A. B., Marti, M. and Köhler, P. (2000). Stage-specific expression and targeting of cyst wall protein-green fluorescent protein chimeras in *Giardia*. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1789–800.
- Heim, R., Prasher, D. C. and Tsien, R. Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 12501–4.
- Huang, Y.-C., Su, L.-H., Lee, G. A., Chiu, P.-W., Cho, C.-C., Wu, J.-Y. and Sun, C.-H. (2008). Regulation of cyst wall protein promoters by Myb2 in *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **283**, 31021–9.
- Jiráková, K., Kulda, J. and Nohýnková, E. (2012). How nuclei of *Giardia* pass through cell differentiation: semi-open mitosis followed by nuclear interconnection. *Protist* **163**, 465–479.
- Kane, A. V., Ward, H. D., Keusch, G. T. and Pereira, M. E. A. (1991). In vitro encystation of *Giardia lamblia*: Large-scale production of in vitro cysts and strain and clone differences in encystation efficiency. *Source J. Parasitol.* **77**, 974–981.
- Karr, C. D. and Jarroll, E. L. (2004). Cyst wall synthase: N-acetylgalactosaminyltransferase activity is induced to form the novel N-acetylgalactosamine polysaccharide in the *Giardia* cyst wall. *Microbiology* **150**, 1237–1243.
- Keister, D. B. (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**, 487–488.
- Konrad, C., Spycher, C. and Hehl, A. B. (2010). Selective condensation drives partitioning and sequential secretion of cyst wall proteins in differentiating *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog.* **6**, e1000835.
- Krtková, J., Thomas, E. B., Alas, G. C. M., Schraner, E. M., Behjatnia, H. R., Hehl, A. B. and Paredes, A. R. (2016). Rac regulates *Giardia lamblia* encystation by coordinating cyst wall protein trafficking and secretion. *MBio* **7**, e01003-16.
- Lanfredi-Rangel, A., Kattenbach, W. M., Diniz, J. A. and Souza, W. (1999). Trophozoites of *Giardia lamblia* may have a Golgi-like structure. *FEMS Microbiol. Lett.* **181**, 245–251.
- Lanfredi-Rangel, A., Attias, M., Reiner, D. ., Gillin, F. . and De Souza, W. (2003). Fine structure of the biogenesis of *Giardia lamblia* encystation secretory vesicles. *J. Struct. Biol.* **143**, 153–163.
- Lauwaet, T., Davids, B. J., Torres-Escobar, A., Birkeland, S. R., Cipriano, M. J., Preheim, S. P., Palm, D., Svärd, S. G., McArthur, A. G. and Gillin, F. D. (2007). Protein phosphatase 2A plays a crucial role in *Giardia lamblia* differentiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **152**, 80–9.
- Lopez, A. B., Sener, K., Jarroll, E. L. and van Keulen, H. (2003). Transcription regulation is

- demonstrated for five key enzymes in *Giardia intestinalis* cyst wall polysaccharide biosynthesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **128**, 51–57.
- Los, G. V., Encell, L. P., McDougall, M. G., Hartzell, D. D., Karassina, N., Zimprich, C., Wood, M. G., Learish, R., Ohana, R. F., Urh, M., et al. (2008). HaloTag: A novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem. Biol.* **3**, 373–382.
- Lujan, H. D., Mowatt, M. R., Byrd, L. G., Nash, T. E., Luján, H. D., Mowatt, M. R., Byrd, L. G. and Nash, T. E. (1996). Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7628–33.
- Luján, H. D., Marotta, A., Mowatt, M. R., Sciaky, N., Lippincott-Schwartz, J. and Nash, T. E. (1995a). Developmental induction of Golgi structure and function in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **270**, 4612–8.
- Luján, H. D., Mowatt, M. R., Conrad, J. T., Bowers, B. and Nash, T. E. (1995b). Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. *J. Biol. Chem.* **270**, 29307–29313.
- Macechko, T. P., Steimle, P. A., Lindmark, D. G., Erlandsen, S. L. and Jarroll, E. L. (1992). Galactosamine-synthesizing enzymes are induced when *Giardia* encyst. *Mol. Biochem. Parasitol.* **56**, 301–309.
- Marti, M., Li, Y., Schraner, E. M., Wild, P., Köhler, P. and Hehl, A. B. (2003a). The secretory apparatus of an ancient eukaryote: protein sorting to separate export pathways occurs before formation of transient Golgi-like compartments. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1433–1447.
- Marti, M., Regös, A., Li, Y., Schraner, E. M., Wild, P., Müller, N., Knopf, L. G. and Hehl, A. B. (2003b). An ancestral secretory apparatus in the protozoan parasite *Giardia intestinalis*. *J. Biol. Chem.* **278**, 24837–48.
- Martincová, E., Voleman, L., Najdová, V., De Napoli, M., Eshar, S., Gualdron, M., Hopp, C. S., Sanin, D. E., Tembo, D. L., Van Tyne, D., et al. (2012). Live imaging of mitochondria and hydrogenosomes by HaloTag technology. *PLoS One* **7**, e36314.
- McCaffery, J. M., Faubert, G. M. and Gillin, F. D. (1994). *Giardia lamblia*: Traffic of a trophozoite variant surface protein and a major cyst wall epitope during growth, encystation, and antigenic switching. *Exp. Parasitol.* **79**, 236–249.
- Mendez, T. L., De Chatterjee, A., Duarte, T. T., Gazos-Lopes, F., Robles-Martinez, L., Roy, D., Sun, J., Maldonado, R. A., Roychowdhury, S., Almeida, I. C., et al. (2013). Glucosylceramide transferase activity is critical for encystation and viable cyst production by an intestinal protozoan, *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **288**, 16747–60.
- Merino, M. C., Zamponi, N., Vranich, C. V., Touz, M. C. and Rópolo, A. S. (2014). Identification of *Giardia lamblia* DHHC proteins and the role of protein S-palmitoylation in the encystation process. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e2997.
- Midlej, V. and Benchimol, M. (2009). *Giardia lamblia* behavior during encystment: How morphological changes in shape occur. *Parasitol. Int.* **58**, 72–80.
- Midlej, V., Meinig, I., de Souza, W. and Benchimol, M. (2013). A new set of carbohydrate-positive vesicles in encysting *Giardia lamblia*. *Protist* **164**, 261–271.
- Misumi, Y., Misumi, Y., Miki, K., Takatsuki, A., Tamura, G. and Ikehara, Y. (1986). Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **261**, 11398–11403.

- Morf, L., Spycher, C., Rehrauer, H., Fournier, C. A., Morrison, H. G. and Hehl, A. B.** (2010). The transcriptional response to encystation stimuli in *Giardia lamblia* is restricted to a small set of genes. *Eukaryot. Cell* **9**, 1566–76.
- Mowatt, M. R., Luján, H. D., Cotten, D. B., Bowers, B., Yee, J., Nash, T. E. and Stibbs, H. H.** (1995). Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst wall protein gene. *Mol. Microbiol.* **15**, 955–963.
- Nohýnková, E., Tůmová, P. and Kulda, J.** (2006). Cell division of *Giardia intestinalis*: Flagellar developmental cycle involves transformation and exchange of flagella between mastigonts of a diplomonad cell. *Eukaryot. Cell* **5**, 753–761.
- Pagano, R. E., Sepanski, M. A. and Martin, O. C.** (1989). Molecular trapping of a fluorescent ceramide analogue at the Golgi apparatus of fixed cells: Interaction with endogenous lipids provides a trans-Golgi marker for both light and electron microscopy. *J. Cell Biol.* **109**, 2067–2079.
- Palm, D., Weiland, M., McArthur, A. G., Winiecka-Krusnell, J., Cipriano, M. J., Birkeland, S. R., Pacocha, S. E., Davids, B., Gillin, F., Linder, E., et al.** (2005). Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **141**, 199–207.
- Pan, Y.-J., Cho, C.-C., Kao, Y.-Y. and Sun, C.-H.** (2009). A novel WRKY-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein genes in *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **284**, 17975–17988.
- Plamont, M.-A., Billon-Denis, E., Maurin, S., Gauron, C., Pimenta, F. M., Specht, C. G., Shi, J., Quérard, J., Pan, B., Rossignol, J., et al.** (2016). Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 497–502.
- Poxleitner, M. K., Carpenter, M. L., Mancuso, J. J., Wang, C.-J. R., Dawson, S. C. and Cande, W. Z.** (2008). Evidence for karyogamy and exchange of genetic material in the binucleate intestinal parasite *Giardia intestinalis*. *Science (80-.)*. **319**, 1530–1533.
- Pries, F., Kingma, J., Krooshof, G. H., Jeronimus-Stratingh, C. M., Bruins, A. P. and Janssen, D. B.** (1995). Histidine 289 is essential for hydrolysis of the alkyl-enzyme intermediate of haloalkane dehalogenase. *J. Biol. Chem.* **270**, 10405–11.
- Reiner, D. S., Douglas, H. and Gillin, F. D.** (1989). Identification and localization of cyst-specific antigens of *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* **57**, 963–8.
- Reiner, D. S., McCaffery, J. M. and Gillin, F. D.** (2001). Reversible interruption of *Giardia lamblia* cyst wall protein transport in a novel regulated secretory pathway. *Cell. Microbiol.* **3**, 459–472.
- Reiner, D. S., Ankarklev, J., Troell, K., Palm, D., Bernander, R., Gillin, F. D., Andersson, J. O. and Svärd, S. G.** (2008). Synchronisation of *Giardia lamblia*: Identification of cell cycle stage-specific genes and a differentiation restriction point. *Int. J. Parasitol.* **38**, 935–944.
- Rivero, M. R. R., Vranich, C. V. V, Bisbal, M., Maletto, B. A. A., Ropolo, A. S. S. and Touz, M. C.** (2010). Adaptor protein 2 regulates receptor-mediated endocytosis and cyst formation in *Giardia lamblia*. *Biochem. J.* **428**, 33–45.
- Robles-Martinez, L., Mendez, T. L., Apodaca, J. and Das, S.** (2017). Glucosylceramide transferase in *Giardia* preferentially catalyzes the synthesis of galactosylceramide during encystation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **211**, 75–83.

- Sagolla, M. S., Dawson, S. C., Mancuso, J. J. and Cande, W. Z.** (2006). Three-dimensional analysis of mitosis and cytokinesis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. *J. Cell Sci.* **119**, 4889–900.
- Schupp, D. G., Januschka, M. M., Sherlock, L. A. F., Stibbs, H. H., Meyer, E. A., Bemrick, W. J. and Erlandsen, S. L.** (1988). Production of viable *Giardia* cysts in vitro: Determination by fluorogenic dye staining, excystation, and animal infectivity in the mouse and Mongolian gerbil. *Gastroenterology* **95**, 1–10.
- Stefanic, S., Palm, D., Svärd, S. G. and Hehl, A. B.** (2006). Organelle proteomics reveals cargo maturation mechanisms associated with Golgi-like encystation vesicles in the early-diverged protozoan *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **281**, 7595–604.
- Stefanic, S., Morf, L., Kulangara, C., Regös, A., Sonda, S., Schraner, E., Spycher, C., Wild, P. and Hehl, A. B.** (2009). Neogenesis and maturation of transient Golgi-like cisternae in a simple eukaryote. *J. Cell Sci.* **122**, 2846–56.
- Su, L.-H., Pan, Y.-J., Huang, Y.-C., Cho, C.-C., Chen, C.-W., Huang, S.-W., Chuang, S.-F. and Sun, C.-H.** (2011). A novel E2F-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein genes in *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **286**, 34101–20.
- Sulemana, A., Paget, T. A. and Jarroll, E. L.** (2014). Commitment to cyst formation in *Giardia*. *Microbiology* **160**, 330–339.
- Sun, C.-H., Palm, D., McArthur, A. G., Svärd, S. G. and Gillin, F. D.** (2002). A novel Myb-related protein involved in transcriptional activation of encystation genes in *Giardia lamblia*. *Mol. Microbiol.* **46**, 971–984.
- Sun, C.-H., McCaffery, J. M., Reiner, D. S. and Gillin, F. D.** (2003). Mining the *Giardia lamblia* genome for new cyst wall proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 21701–8.
- Sun, C.-H., Su, L.-H. and Gillin, F. D.** (2006). Novel plant-GARP-like transcription factors in *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **146**, 45–57.
- Touz, M. C., Gottig, N., Nash, T. E. and Lujan, H. D.** (2002a). Identification and characterization of a novel secretory granule calcium-binding protein from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **277**, 50557–50563.
- Touz, M. C., Nores, M. J., Slavin, I., Carmona, C., Conrad, J. T., Mowatt, M. R., Nash, T. E., Coronel, C. E. and Luján, H. D.** (2002b). The activity of a developmentally regulated cysteine proteinase is required for cyst wall formation in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **277**, 8474–81.
- Touz, M. C., Kulakova, L. and Nash, T. E.** (2004). Adaptor protein complex 1 mediates the transport of lysosomal proteins from a Golgi-like organelle to peripheral vacuoles in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3053–60.
- Touz, M. C., Rópolo, A. S., Rivero, M. R., Vranich, C. V., Conrad, J. T., Svärd, S. G. and Nash, T. E.** (2008). Arginine deiminase has multiple regulatory roles in the biology of *Giardia lamblia*. *J. Cell Sci.* **121**, 2930–8.
- Van Keulen, H., Steimle, P. A., Bulik, D. A., Borowiak, R. K., Jarroll, E. L., Van Keulen, H., Steimle, P. A., Bulik, D. A., Borowiak, R. K. and Jarroll, E. L.** (1998). Cloning of two putative *Giardia lamblia* glucosamine 6-phosphate isomerase genes only one of which is transcriptionally activated during encystment. *J. Eukaryot. Microbiol.* **45**, 637–642.
- Voleman, L., Najdrová, V., Ástvaldsson, Á., Tůmová, P., Einarsson, E., Švindrych, Z., Hagen, G.**

- M., Tachezy, J., Svärd, S. G. and Doležal, P.** (2017). *Giardia intestinalis* mitochondria undergo synchronized fission but not fusion and are constitutively associated with the endoplasmic reticulum. *BMC Biol.* **15**, 27.
- Vranych, C. V., Rivero, M. R., Merino, M. C., Mayol, G. F., Zamponi, N., Maletto, B. A., Pistoiresi-Palencia, M. C., Touz, M. C. and Rópolo, A. S.** (2014). SUMOylation and deimination of proteins: Two epigenetic modifications involved in *Giardia* encystation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1843**, 1805–1817.
- Wang, C.-H., Su, L.-H. and Sun, C.-H.** (2007). A novel ARID/Bright-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein 1 gene in *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **282**, 8905–14.
- Wang, Y.-T., Pan, Y.-J., Cho, C.-C., Lin, B.-C., Su, L.-H., Huang, Y.-C. and Sun, C.-H.** (2010). A novel pax-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein genes in *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **285**, 32213–26.
- Wei, R. R., Al-Bassam, J. and Harrison, S. C.** (2007). The Ndc80/HEC1 complex is a contact point for kinetochore-microtubule attachment. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 54–59.
- Zamponi, N., Zamponi, E., Mayol, G. F., Lanfredi-Rangel, A., Svärd, S. G., Touz, M. C. M. C., Svärd, S. G. and Touz, M. C. M. C.** (2017). Endoplasmic reticulum is the sorting core facility in the Golgi-lacking protozoan *Giardia lamblia*. *Traffic* **18**, 604–621.

*sekundární citace

10 Seznam příloh

Příloha 1: Pozorování ESV váčků v buňkách obsahujících konstrukt CWP1-HaloTag *in vivo* využitím metody enzymatického značení HaloTagem. Buňky byly pozorovány po dobu dvou hodin v PBS po 17 hodinách indukce encystace. Snímek byl pořízen každou minutu. Jedna sekunda záznamu představuje sedm snímků (sedm minut). Celé video zaznamenává 120 minut encystace. Je značen protein CWP1-HaloTag. Většina ESV váčků se během pozorování jevila nehybná. Bylo možné pozorovat pohyb jednoho periferního váčku směrem do vnitra buňky. Během pozorování se také objevil předtím nepozorovaný ESV váček. Snímky byly pořízeny prostřednictvím wide-field mikroskopie.

Příloha 2: *In vivo* pozorování encystujících trofozoitů, kteří obsahovali CWP1 protein značený enzymatickým tagem Y-FAST (zeleně). Buňky byly indukovány k encystaci 24 hodin, po kterých byly převedeny do PBS s obsahem glukózy. Pozorování bylo zahájeno 3 hodiny a 20 minut po výměně encystačního média za PBS. Snímek byl pořízen každé čtyři minuty. Jedna sekunda záznamu představuje sedm snímků (28 minut). Celé video zaznamenává 176 minut. Během pozorování této buňky bylo možné spatřit malý ESV váček, který migroval buňkou. Také bylo možné pozorovat váček, který se oddělil od většího ESV váčku. Snímky byly pořízeny prostřednictvím wide-field mikroskopie.

Příloha 3: *In vivo* pozorování encystujících trofozoitů, kteří obsahovali CWP1 protein značený enzymatickým tagem Y-FAST (zeleně). Buňky byly indukovány encystačním médiem po dobu 24 hodin, po kterých byly převedeny do PBS s obsahem glukózy. Pozorování bylo zahájeno 4 hodiny a 44 minut po výměně encystačního média za PBS. Snímek byl pořízen každé čtyři minuty. Jedna sekunda záznamu představuje sedm snímků (28 minut). Celé video představuje 92 minut. V této buňce došlo k akumulaci značeného CWP1 proteinu v oblasti adhezivního disku, podél kterého byl později transportován. Snímky byly pořízeny prostřednictvím wide-field mikroskopie.

Příloha 4: *In vivo* pozorování encystačním médiem indukované buňky prostřednictvím chimerického proteinu β -giardin-HA-Y-FAST (zeleně). Buňky byly encystovány dvě hodiny, po kterých k nim byl přidán HMBR substrát a bylo zahájeno pozorování. Záznam začíná v 95 minutě. Snímek byl pořízen každých pět minut. Jedna sekunda záznamu představuje sedm snímků (35 minut). Celé video představuje 355 minut. Během pozorování stejné buňky nebyly zaznamenány žádné

změny ve struktuře adhezivního disku. Snímky byly pořízeny prostřednictvím konfokální mikroskopie.

Příloha 5: *In vivo* pozorování encystujících trofozoitů kmene WB (ATCC 30957). Buňky byly pozorovány v encystačním médiu s 0,5% agarózou. Pozorování buněk bylo zahájeno hodinu po výměně kultivačního média za encystační. Snímány byly buňky každé čtyři minuty. Jedna sekunda záznamu představuje sedm snímků (28 minut). Záznam začíná po 80 minutách snímání. Celé video zaznamenává 160 minut. Přibližně dvě hodiny od začátku pozorování bylo možné spatřit ESV váčky. V následujících dvou hodinách došlo k zvětšování ESV váčků, které během pozorování zůstaly na stejné pozici v rámci buňky. Snímky byly pořízeny prostřednictvím wide-field mikroskopie zobrazením DIC.

Příloha 6: *In vivo* pozorování encystujících trofozoitů kmene WB (ATCC 30957). Buňky byly pozorovány v encystačním médiu s 0,5% agarózou. Pozorování buněk bylo zahájeno šest hodin od počátku indukce encystace. Jedna sekunda záznamu představuje sedm snímků (28 minut). Celé video zaznamenává 372 minut. Pozorována byla buňka, která již obsahovala několik ESV váčků. Během následujících šesti hodin došlo k značnému nárůstu počtu ESV váčků v buňce. Došlo také k zvětšení a zakulacení sledované buňky. Snímky byly pořízeny prostřednictvím wide-field mikroskopie zobrazením DIC.

Příloha 7: *In vivo* pozorování encystujících trofozoitů *G. intestinalis* kmene WB (ATCC 30957). Buňky byly pozorovány v encystačním médiu s 0,5% agarózou. Buňky byly pozorovány po 12 hodinách encystace. Snímky byly pořizovány každé čtyři minuty. Jedna sekunda záznamu představuje sedm snímků (28 minut). Celé video zaznamenává 440 minut. Na začátku pozorování obsahovala sledovaná buňka značný počet velkých ESV váčků. Během pozorování se zdálo, že se tyto váčky rozpadly na větší počet menších váčků. Buňka se na konci pozorování zakulatila. Během snímání se sledovaná buňka občas částečně vyskytovala mimo záběr. Snímky byly pořízeny prostřednictvím wide-field mikroskopie zobrazením DIC.